

Aus dem Institut für Lungenforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernd Schmeck

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss von *Legionella pneumophila*
outer membrane vesicles auf die
bakterielle Replikation in Makrophagen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anna Lena Jung, geb. Merkel

aus Karlsruhe

Marburg, 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der Philipps-
Universität Marburg <http://archiv.ub.uni-marburg.de>

Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer Creative Commons
Namensnennung Keine kommerzielle Nutzung Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 08.09.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Bernd Schmeck

Korreferent: Herr Prof. Dr. Stefan Bauer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	4
Summary	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Sekretionssysteme gramnegativer Bakterien	7
1.2 <i>outer membrane vesicles</i> (OMV).....	8
1.3 <i>Legionella pneumophila</i>	10
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	13
2 Ergebnisse	14
2.1 Proinflammatorische Aktivierung von Makrophagen	14
2.2 Veränderung der bakteriellen Replikation.....	15
2.3 Reduzierte Reaktion von Makrophagen auf die Infektion mit <i>L. pneumophila</i>	16
2.4 Analyse der ursächlichen OMV Komponenten	17
2.5 Untersuchung beteiligter Signalwege	19
3 Diskussion.....	24
4 Literaturverzeichnis.....	33
5 Anhang	46
5.1 <i>Legionella pneumophila</i> -derived outer membrane vesicles promote bacterial replication in macrophages.....	46
5.2 Angabe der eigenen Anteile an der für die Dissertation berücksichtigten Publikation..	82
5.3 Tabellarischer Lebenslauf.....	83
5.4 Tagungsbeiträge	84
5.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	86
5.6 Danksagung	87
5.7 Ehrenwörtliche Erklärung.....	88

Abkürzungsverzeichnis

A549	Typ II-Pneumozyten-Zelllinie
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2A1	<i>Bcl-2-related protein A1</i>
CD206	<i>mannose receptor C type 1</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
Δ dotA	Legionellenmutante ohne funktionelles dot/icm Sekretionssystem
Δ flaA	Flagellin-defiziente Legionellenmutante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dot/icm	<i>defective in organelle trafficking/intracellular multiplication</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
fliC	Flagellin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i> Zelllinie
IcmK	<i>deficient in organelle trafficking K</i>
IFN- γ	Interferon γ
I κ B α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IKK	I κ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRAK-1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LCV	<i>Legionella containing vacuole</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M1	klassisch aktivierte Makrophagen

Abkürzungsverzeichnis

M2	alternativ aktivierte Makrophagen
mBMDM	<i>murine bone marrow-derived macrophages</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>M. bovis</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
OMV	<i>outer membrane vesicle</i>
p.i.	<i>post infection</i>
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p65	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (relA)</i>
Pam3CSK4	Pam3Cys-Ser-(Lys)4
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pri-mir	<i>primary miRNA</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
SAPK	<i>stress activated protein kinase</i>
scr	<i>scramble</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
T1SS	Typ 1 Sekretionssystem
THP-1	humane, monozytäre Zelllinie
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
UTR	untranslatierter Bereich

Zusammenfassung

Gramnegative Bakterien treten über die Sekretion verschiedenster Moleküle mit ihrer Umwelt in Kontakt. Die Freisetzung von Proteinen und Nukleinsäuren kann aber nicht nur über die bakteriellen Sekretionssysteme vermittelt werden, sondern auch über *outer membrane vesicles* (OMVs) erfolgen. Diese kleinen, sphäroiden Membranvesikel werden von allen gramnegativen Bakterien gebildet und können über weite Entfernung wirken, da die zu transportierenden Proteine vor dem Abbau durch Proteasen geschützt sind. OMVs von Pathogenen können das angeborene Immunsystem aktivieren und immunmodulatorisch wirken.

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) ist ein Auslöser schwerer, atypischer Pneumonien. Diese gramnegativen, stäbchenförmigen Bakterien kommen ubiquitär in der Umwelt vor und vermehren sich in Amöben. Die Inhalation von *L. pneumophila* führt in der humanen Lunge zur Infektion von Alveolarmakrophagen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *L. pneumophila*-OMVs auf humane und murine Makrophagen untersucht. Differenzierte THP-1-Zellen wurden mit steigenden Dosen OMVs behandelt, was zur TLR2-abhängigen proinflammatorischen Aktivierung der Zellen führte. Die Zytokinfreisetzung wurde durch TLR2-Aktivierung und nachfolgende Signaltransduktion über NF- κ B vermittelt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von OMVs auf eine nachfolgende Infektion mit *L. pneumophila* untersucht. In einer frühen Phase der Infektion führte die OMV-Vorbehandlung der Makrophagen zu einem Rückgang der bakteriellen Replikation, wohingegen die Replikation im weiteren Verlauf der Infektion durch OMVs gesteigert wurde. Die Makrophagen waren permissiver für eine Infektion und hatten mehr Legionellen-Vakuolen pro Zelle. Der Anstieg der bakteriellen Replikation war unabhängig von den in den OMVs transportierten Proteinen oder Nukleinsäuren, konnte jedoch mit der Aktivierung von TLR2 in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Signaltransduktion über IRAK-1 und die nukleäre Translokation von p65 vermittelt wurde. Die Makrophagen reagierten mit verminderter Expression proinflammatorischer Gene auf eine Infektion mit *L. pneumophila*, wenn sie zuvor mit OMVs inkubiert wurden. Die Induktion der antiinflammatorischen *microRNA-146a* (miR-146a) nach OMV-Stimulation erfolgte TLR2- und NF- κ B-vermittelt und resultierte in einer degradationsbedingten Abwesenheit von IRAK-1 in Makrophagen. Transfektionsexperimente zeigten, dass sowohl die Überexpression von miR-146a als auch der siRNA-vermittelte *knockdown* von IRAK-1 die Legionellenreplikation steigern.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass *L. pneumophila*-OMVs potente proinflammatorische Aktivatoren für humane und murine Makrophagen sind und diese über TLR2 aktivieren. Die nachfolgende Infektion der Zellen mit *L. pneumophila* resultiert in einer gesteigerten Replikation, die miR-146a- und IRAK-1-abhängig ist. OMVs können so die bakterielle Replikation begünstigen und möglicherweise zur Ausbreitung der Infektion in der humanen Lunge beitragen.

Summary

Gram-negative bacteria secrete various molecules to communicate with their environment. The secretion of proteins and nucleic acids cannot only be mediated via secretion systems, but also via outer membrane vesicles (OMVs). These small, spheroid membrane vesicles are produced by all Gram-negative bacteria and can deliver their cargo via long distances, as the transported proteins are protected from proteolytic degradation. OMVs from pathogenic bacteria can activate the innate immune system and can be immuno-modulatory.

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) is a causative agent of severe, atypical pneumonia. These Gram-negative, rod-shaped bacteria occur ubiquitously and replicate in amoeba. Inhalation of *L. pneumophila* in human lungs leads to the infection of alveolar macrophages.

In this work, the influence of *L. pneumophila* OMVs on human and murine macrophages was analyzed. Differentiated THP-1 cells were incubated with increasing OMV doses, which led to a TLR2-dependent pro-inflammatory activation of the cells. The cytokine secretion was induced through TLR2 activation and subsequent signal transduction via NF- κ B. Furthermore, the impact of OMVs on a following infection with *L. pneumophila* was examined. In an early phase of infection, OMV pre-treatment of macrophages resulted in reduced bacterial replication, whereas at a later time point, replication was increased. Macrophages were more permissive for an infection and had more *Legionella*-containing vacuoles per cell. The increased bacterial replication was independent of the transported proteins and nucleic acids, but could be associated with TLR2 activation. Additionally, it could be shown that the intracellular signal transduction was mediated via IRAK-1 and the nuclear translocation of p65. Macrophages responded with a reduced expression of pro-inflammatory genes to an infection with *L. pneumophila* when they were pre-incubated with OMVs. The induction of the anti-inflammatory microRNA-146a (miR-146a) after OMV stimulation was TLR2- and NF- κ B-mediated and resulted in a degradation-dependent absence of IRAK-1 in macrophages. Transfection experiments could demonstrate that the overexpression of miR-146a as well as the siRNA-mediated knockdown of IRAK-1 could induce *L. pneumophila* replication.

In summary, the experiments demonstrated that *L. pneumophila* OMVs are potent pro-inflammatory stimulators for human and murine macrophages and that they activate them via TLR2. The subsequent infection with *L. pneumophila* results in an increased bacterial replication which depends on miR-146a and IRAK-1. OMVs can hereby promote the bacterial replication and possibly lead to the spreading of the infection in human lungs.

1 Einleitung

1.1 Sekretionssysteme gramnegativer Bakterien

Prokaryoten treten über Sekretion verschiedenster Effektormoleküle mit ihrer Umwelt in Kontakt. Dafür haben sie eine beachtliche Anzahl unterschiedlicher, hochspezialisierter Strategien der Freisetzung jeglicher Substrate entwickelt. Sie können, abhängig von ihrer Umgebung und dem physiologischen Kontext in dem sie sich befinden, kleine Moleküle, Proteine und DNA abgeben um in ihrer Umgebung zu überleben (Cambronne und Roy 2006).

In gramnegativen Bakterien unterscheidet man zwei Kategorien von Sekretionssystemen: solche, die sowohl die innere als auch die äußere bakterielle Membran überspannen und solche, die nur die äußere bakterielle Membran überspannen. Bis heute sind fünf Sekretionssysteme (Typ 1-4 und Typ 6) der ersten Kategorie beschrieben und lediglich eines der zweiten Kategorie (Typ 5). Der Transport von Substraten über beide Membranen dient dazu, die zu transportierenden Moleküle aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum oder in eine Zielzelle zu sekretieren, sofern diese sich in unmittelbarer Nähe befindet. Die Sekretion bakterieller Effektoren über die innere Membran in den periplasmatischen Raum ist meist gefolgt von einem zweiten Transportschritt über die äußere Membran (Costa *et al.* 2015).

Die über Typ 1-Sekretionssysteme (T1SS) freigesetzten Effektoren dienen in pathogenen gramnegativen Bakterien häufig der Nährstoffbeschaffung oder der Virulenz, die Freisetzung erfordert Adenosintriphosphat (ATP). Die zu transportierenden Moleküle werden in einem Schritt über beide Membranen in den extrazellulären Raum transportiert (Kanonenberg *et al.* 2013). Typ 2-Sekretionssysteme (T2SS) ermöglichen den Transport von ungefalteten Substraten, wie zum Beispiel Enzymen und Toxinen, in das Periplasma, um dort die Faltung zu gestatten, um dann in einem zweiten Schritt über die äußere Membran transportiert zu werden (Nivaskumar und Francetic 2014). Typ 3-Sekretionssysteme (T3SS) sind darauf spezialisiert, bakterielle Proteine in eukaryote Zellen über Poren in der Zielzellmembran einzubringen, um deren Funktion und Reaktion auf das Bakterium zu beeinflussen und so die bakterielle Kolonialisierung oder Invasion zu ermöglichen (Buttner 2012). Zur Freisetzung von DNA werden ausschließlich Typ 4-Sekretionssysteme (T4SS) genutzt, welche aber auch Proteine sekretieren können. Ihre bekannteste Funktion ist die Übertragung von Plasmid-DNA und die damit verbundene Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen. Da Konjugation eine sehr verbreitete Fähigkeit von sowohl gramnegativen und grampositiven Bakterien als auch einigen Archaeen ist, ist dieses Sekretionssystem das am weitesten verbreitete (Alvarez-

Martinez und Christie 2009). Das Typ 5-Sekretionssystem (T5SS) ist auch als Autotransporter-System bekannt. Hier liegt das Substrat mit dem Poren-formenden Protein als Polypeptid vor. So kann das Polypeptid seine eigene Sekretion über die äußere Membran ermöglichen. Diese zweistufige Sekretion spielt eine Rolle bei der Virulenz, Zell-Zell-Adhäsion und Biofilm-Bildung (Leo *et al.* 2012). Toxische Effektorproteine werden in eukaryote und prokaryote Zielzellen mittels Typ 6-Sekretionssystem (T6SS) eingebracht, wobei der Mechanismus dem der Phagen ähnelt. Diese Art der Sekretion dient vorwiegend der Pathogenese (Ho *et al.* 2014).

Durch diese Vielzahl an Sekretionsmaschinerien können die unterschiedlichsten Moleküle entweder zielgerichtet in Empfängerzellen eingebracht werden oder frei sekretiert werden und so über eine weite Entfernung wirken.

1.2 *outer membrane vesicles* (OMV)

Neben den Sekretionssystemen haben gramnegative Bakterien, genau wie eukaryote Zellen, die Möglichkeit, Membranvesikel abzugeben. Bei diesen als *outer membran vesicles* (OMV) bezeichneten Vesikeln, handelt es sich um 10-300 nm kleine, sphäroide Membran-umschlossene Vesikel, die von der äußeren Membran gramnegativer Bakterien abgegeben werden. Diese Membran setzt sich aus einer Vielzahl an Phospholipiden und Membranproteinen zusammen und trägt darüber hinaus Lipopolysaccharid (LPS) auf der Oberfläche (Beveridge 1999; Ellis und Kuehn 2010). Das Lumen der Vesikel kann periplasmatische oder zytoplasmatische Proteine, RNA, DNA und Peptidoglykan enthalten (Kaparakis *et al.* 2010; Bonnington und Kuehn 2014; Fulsundar *et al.* 2014). Da die Komposition an Proteinen nicht exakt der der äußeren Membran und des periplasmatischen Raums entspricht, wird angenommen, dass es einen Sortiermechanismus für die Beladung von Proteinen in OMVs gibt (Kesty und Kuehn 2004; Choi *et al.* 2011). Die in OMVs freigesetzten Moleküle werden durch die umgebende Membran vor dem Abbau durch Proteasen und Nukleasen geschützt und können so längere Zeit in extrazellulärer Umgebung vorliegen. Somit können aktive Virulenzfaktoren über weite Entfernung wirken und werden nicht nur lokal am Infektionsherd gefunden (Dorward *et al.* 1991; Kolling und Matthews 1999; Horstman und Kuehn 2000; Chi *et al.* 2003).

Gramnegative Bakterien setzen natürlicherweise in allen Wachstumsphasen und unter allen Wachstumsbedingungen OMVs frei (Kuehn und Kesty 2005; Manning und Kuehn 2013), jedoch sind die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt. OMVs sind nicht die Folge von Zelllyse oder -tod; sie werden reichlich in Bereichen gebildet, in denen sich das Bakterium teilt (Devoe und Gilchrist 1973; Gamazo und Moriyon 1987). Des Weiteren gibt es

Einleitung

Untersuchungen, welche die Entstehung von OMVs mit Stress assoziiert haben (McBroom und Kuehn 2007). Dabei wurden unter anderem der Einfluss von Temperatur (Katsui *et al.* 1982; Eddy *et al.* 2014), Aminosäurelimitation (Knox *et al.* 1966; van de Waterbeemd *et al.* 2013), Antibiotika (Kadurugamuwa und Beveridge 1995) und die Absorption von Phagen betrachtet (Loeb und Kilner 1978).

Es gibt verschiedene Modelle, die die Biogenese von OMVs beschreiben. In *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde gezeigt, dass sich die äußere Membran nach außen stülpt, wenn in Bereichen weniger Lipoprotein vorliegt, welches die Peptidoglykanschicht mit der äußeren Membran verbindet und so stabilisiert (siehe Abbildung I). Ein weiteres Modell besagt, dass OMVs gebildet werden, wenn Peptidoglykanfragmente nicht wieder in das bakterielle Zytoplasma zurück transportiert werden und so lokal ein hoher Druck entsteht. Ein drittes Modell aus *Pseudomonas aeruginosa* beschreibt die OMV-Biogenese so, dass durch ionische Wechselwirkungen zwischen *Quorum Sensing*-Molekülen und Magnesium-Ionen eine Abstoßung der LPS-Moleküle entsteht und so die äußere Membran Blasen bildet (Mashburn-Warren und Whiteley 2006). Weitere Untersuchungen werden klären müssen, ob es einen generellen Mechanismus der OMV-Biogenese gibt oder ob alle bisher beschriebenen zutreffen.

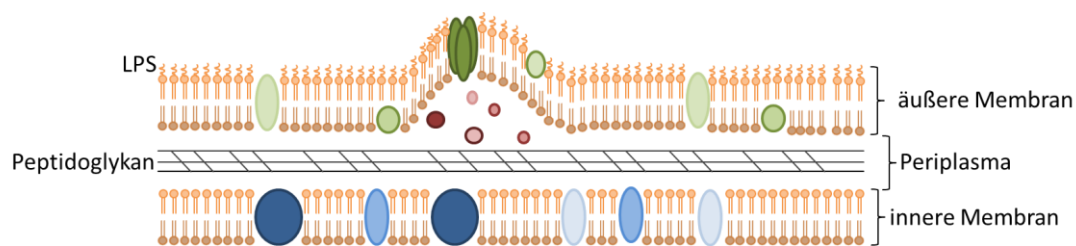


ABBILDUNG I: MODELL DER OMV-BIOGENESE

OMVs können zur Kommunikation zwischen Bakterien dienen, um eine geeignete Mikroumgebung zu schaffen, Nährstoffe zu gewinnen oder zum Überleben beitragen (Schooling und Beveridge 2006; Bonnington und Kuehn 2014). Als Köder können sie Antikörper abfangen, oder sie dienen als Schutz gegen Antibiotika, Bakteriophagen oder Viren (Pettit und Judd 1992; Kadurugamuwa und Beveridge 1995; Manning und Kuehn 2011). Sie können aber auch von eukaryoten Zellen erkannt und aufgenommen werden (Kuehn und Kesty 2005). Virulenz und Pathogenese können beeinflusst oder genetische Transformation hervorgerufen werden. Der Verlauf einer Infektion und die Wirtsimmunantwort kann moduliert werden, da OMVs Antigene und Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (engl.: *pathogen associated molecular pattern*, PAMP) wie LPS und Peptidoglykan transportieren (Ellis *et al.* 2010). *Acinetobacter baumannii*-OMVs induzieren die Sekretion von Zytokinen in Epithelzellen (Jun *et*

al. 2013), *Clostridium perfringens*-OMVs wirken auf Makrophagen (Jiang *et al.* 2014), *Borellia burgdorferi*-OMVs können B-Zellen aktivieren (Whitmire und Garon 1993) und *Helicobacter pylori*-OMVs wirken proinflammatorisch auf Magenepithelzellen (Ismail *et al.* 2003). Ferner können OMVs die bakterielle Bindung an und die Invasion in Wirtszellen verstärken und darüber hinaus zytotoxisch wirken (Kuehn und Kesty 2005).

Die Rolle von OMVs wurde aber bisher nicht nur *in vitro* untersucht, sondern in einigen Studien auch *in vivo* analysiert. In Biopsien von chronischen *Helicobacter pylori*-Infektionen konnten Vesikel nachgewiesen werden (Keenan *et al.* 2000). Außerdem wurde in der zerebrospinalen Flüssigkeit eines an Meningitis leidenden Kindes OMVs von *Neisseria meningitidis* gefunden (Stephens *et al.* 1982). Diese OMVs wirken immunogen, wenn sie Mäusen intranasal appliziert werden (Saunders *et al.* 1999). *Salmonella typhimurium*-OMVs können *in vivo* zur Bildung von *Salmonella*-spezifischen Antikörpern und einer T-Zell-vermittelten Immunantwort führen (Alaniz *et al.* 2007). Da OMVs natürlicherweise der bakteriellen Oberfläche ähneln, LPS und Lipoprotein präsentieren und so die angeborene Immunantwort über die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 4 und 2 aktivieren können (Beveridge 1999; Jin *et al.* 2007), wird ihre Fähigkeit, eine humorale Immunität zu vermitteln, untersucht. Die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen über die genannten Rezeptoren und die damit verbundene Signalübertragung und Genexpression sind essentiell für die Induktion einer adaptiven Immunantwort (Maisonnette *et al.* 2014). OMVs werden daher bereits heute erfolgreich als Vakzin eingesetzt (Oster *et al.* 2005; O’Ryan *et al.* 2014).

1.3 *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) wurde 1977 identifiziert, nachdem 1976 bei einer Tagung von US-Veteranen in Philadelphia etwa 200 Männer an einer schweren Lungenentzündung erkrankten und einige von ihnen sogar daran verstarben (McDade *et al.* 1977). Die folgenden Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um die Infektion mit gramnegativen, stäbchenförmigen Bakterien handelte, die überall in der Umgebung in Frischwasserbiotopen vorkommen (Lau und Ashbolt 2009) (siehe Abbildung II). Sie wurden schließlich nach ihren Opfern und der Lokalisation in der Lunge als *Legionella pneumophila* benannt (Brenner *et al.* 1979). Sie gehören zur Familie der *Legionellaceae*, Genus *Legionella*. Die fakultativ aeroben Bakterien verfügen über ein oder mehrere polare oder laterale Flagellen. Es sind 57 *Legionella* Arten bekannt, die mindestens 79 Serogruppen umfassen. Sie werden alle als potentiell humanpathogen eingestuft, jedoch ist *L. pneumophila* die klinisch am

Einleitung

häufigsten nachgewiesene Art und für 90 % der Erkrankungen verantwortlich (Robert-Koch-Institut 2013).

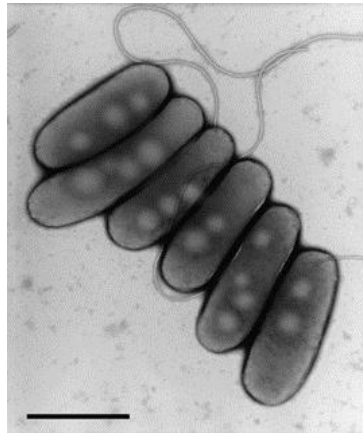


ABBILDUNG II: *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila*, Serogruppe 1, mit Negativkontrastierung. Maßstab = 1 μm (Robert-Koch-Institut 2014).

Legionellen vermehren sich in der Regel nicht frei im Wasser, sondern intrazellulär, in sich im Wasser befindenden Amöben. Sie nutzen durch ihr parasitäres Verhalten deren Nährstoffreserven und sind vor schädlichen Umwelteinflüssen geschützt (Palusinska-Szysk und Janczarek 2010). Des Weiteren können sie sich extrazellulär vermehren, wenn sie Biofilme bilden (Taylor *et al.* 2009). Sie können aber nicht nur in natürlichen Süßwasserhabitaten vorkommen, sondern auch in von Menschen geschaffenen Warmwassersystemen. Hier bieten Wasserleitungen, Klimaanlage und Whirlpools optimale Bedingungen und stellen so potentielle Infektionsquellen über Aerosolbildung dar. Menschen, bei denen es sich lediglich um einen Fehlwirt handelt, können sich durch Inhalation kontaminierten Wassers infizieren. Gelangen Legionellen in die menschliche Lunge, werden dort vorwiegend Alveolarmakrophagen infiziert (Muder *et al.* 1986). Die Legionellose kann einerseits zum mild verlaufenden Pontiac-Fieber führen oder andererseits zu einer schwerwiegenden, atypischen Pneumonie, der Legionärskrankheit. *L. pneumophila* ist für 5 % aller Fälle ambulant erworbener Pneumonien verantwortlich und hat eine Mortalitätsrate von 10-15 % (Falco *et al.* 1991; Lau und Ashbolt 2009; Robert-Koch-Institut 2013). Dabei haben ältere und immunsupprimierte Menschen ein höheres Risiko, eine schwere Lungenentzündung zu entwickeln (Shin 2012). Da bis auf einen Fallbericht (Correia *et al.* 2016) keine Mensch-zu-Mensch Übertragungen beschrieben sind, könnte vermutet werden, dass *L. pneumophila* nicht gut an den Menschen angepasst ist. Auf zellulärer Ebene können die Ähnlichkeiten im

Einleitung

Lebenszyklus zwischen Amöben und der Replikation in den menschlichen Alveolarmakrophagen festgestellt werden (Price *et al.* 2014).

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Anheftung von *L. pneumophila* und der nachfolgenden Phagozytose (Newton *et al.* 2010) (siehe Abbildung III). Nach Internalisierung befinden sich die Legionellen in einer Vakuole in der Wirtszelle, die auch als *Legionella containing vacuole* (LCV) bezeichnet wird. Durch gezielte Manipulation der Wirtszelle können die Bakterien nun replizieren. Sie sekretieren über 300 Effektorproteine über ihr dot/icm T4SS in das Wirtszytosol (Isberg *et al.* 2009). Die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom kann nicht mehr stattfinden. Die Sekretion der Effektorproteine führt zur Rekrutierung von Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums, Ribosomen und Mitochondrien. Eine Nische entsteht, die das Überleben der Bakterien und ihre Replikation ermöglichen (Isberg *et al.* 2009; Hubber und Roy 2010). *L. pneumophila* ohne funktionelles dot/icm Sekretionssystem ist nicht in der Lage, in Makrophagen zu replizieren, da keine LCV entsteht und die endolysosomale Degradation der Bakterien möglich ist (Berger *et al.* 1994). Nach erfolgreich abgeschlossener Replikation differenzieren die Bakterien von der replikativen zur transmissiven Form. Es entstehen Poren in der Makrophagenmembran, die Wirtszelle lysiert und die virulenten Legionellen werden freigesetzt (Newton *et al.* 2010).

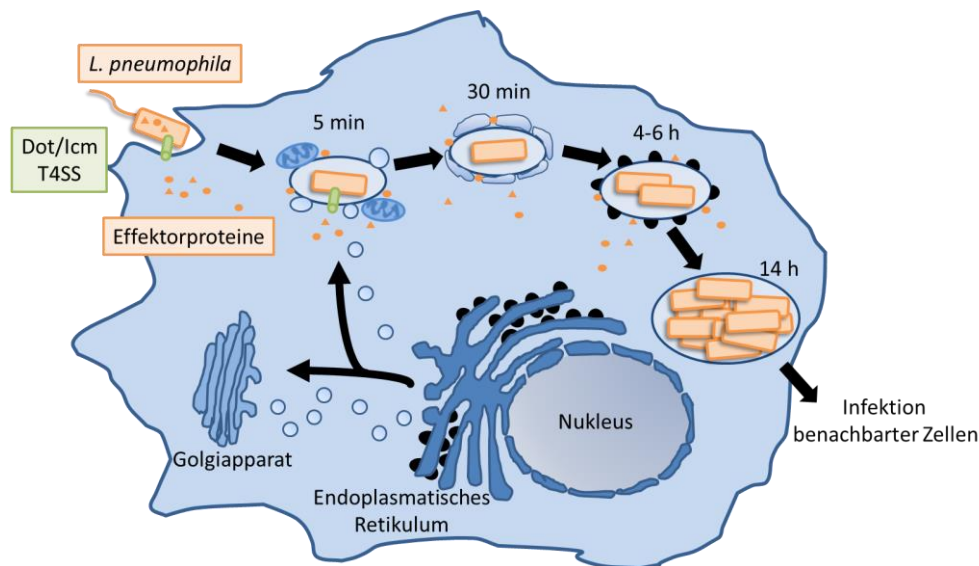


ABBILDUNG III: REPLIKATIONSZYKLUS VON *L. PNEUMOPHILA* IN MAKROPHAGEN

Modifiziert nach (Isberg *et al.* 2009).

Die Inhibition der Phagosom-Lysosom Fusion kann nicht nur über Effektorproteintranslokation, sondern auch durch OMV-Freisetzung erreicht werden (Fernandez-Moreira *et al.* 2006). *L. pneumophila* sekretiert OMVs sowohl wenn sie extrazellulär vorliegen, als auch wenn sie

sich in einer LCV befinden (Fernandez-Moreira *et al.* 2006). *L. pneumophila*-OMVs sind bereits hinsichtlich der enthaltenen Proteine charakterisiert (Galka *et al.* 2008). Es wurden etwa 70 Proteine gefunden, die exklusiv über OMVs freigesetzt werden und deren Funktion mit der Virulenz von Legionellen in Verbindung gebracht werden konnte, zum Beispiel Moleküle für das intrazelluläre Überleben und die Replikation (ProA1 (Tyson *et al.* 2013)), die Invasion (IcmK (Vincent *et al.* 2006)) oder Ausbreitung in der Lunge (fliC (DebRoy *et al.* 2006)). Die Vesikel weisen außerdem proteolytische und lipolytische Aktivität auf (Galka *et al.* 2008) und ihre Applikation in einem humanen Lungenmodell führt zur Gewebeschädigung (Jager *et al.* 2014). Sie werden überwiegend von Makrophagen in der Lunge aufgenommen (Jager *et al.* 2014) und fusionieren mit diesen auch *in vitro* sehr schnell (Jager *et al.* 2014).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Für OMVs verschiedener gramnegativer Bakterien sind immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben worden, zum Beispiel für *Brucella abortus* (Pollak *et al.* 2012) und *Porphyromonas gingivalis* (Duncan *et al.* 2004). Es sollte daher die Frage untersucht werden, ob das ebenso für *L. pneumophila*-OMVs gilt. Ihr Einfluss auf humane und murine Makrophagen, deren Phänotyp und eine nachfolgende Infektion dieser Zellen sollte analysiert werden. Da die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf bakterielle Erreger hauptsächlich von der Erkennung von PAMPs abhängt, sollte des Weiteren geklärt werden, welche Rezeptoren und Signalwege in die Reaktion von Makrophagen auf *L. pneumophila*-OMVs beteiligt sind und welche bakteriellen Komponenten dies hervorrufen.

2 Ergebnisse

2.1 Proinflammatorische Aktivierung von Makrophagen

Da es sich bei Makrophagen um die wichtigste Zielzelle der Legionelleninfektion handelt, wurde der Einfluss von *L. pneumophila*-OMVs auf eine humane Monozyten-Zelllinie getestet. Für alle beschriebenen Experimente wurden mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit steigenden Dosen OMVs (0,01-25 µg/mL) behandelt. Nach Inkubation für 24 und 48 h wurden die Zellüberstände auf sekretiertes IL-8 als Maß für die proinflammatorische Aktivierung der Zellen getestet. THP-1-Zellen reagierten bereits auf die niedrigste eingesetzte Dosis (0,01 µg/mL) mit einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (siehe Abbildung 1A). Die Freisetzung von IL-8 zeigte sich zeit- und dosisabhängig. Keine der zur Stimulation der Makrophagen verwendeten OMV-Dosen führte zu einer Abnahme der Viabilität der THP-1-Zellen (siehe Abbildung S1).

Um die Dosis an OMVs, die unter Infektionsbedingungen in Zellkultur entstehen, besser abschätzen zu können, wurden THP-1-Zellen mit *L. pneumophila* infiziert und der Überstand differentiell zentrifugiert. Die so angereicherten Vesikel (<220 nm im Durchmesser) (Thery *et al.* 2006) wurden daraufhin auf ihren relativen LPS-Gehalt untersucht. Hierzu wurden definierte Mengen von OMVs und präparierte Vesikel aus der Infektion im *Dot Blot* verglichen. Es zeigte sich, dass nach 24 h Infektion eine freie OMV-Menge von etwa 0,04-0,08 µg/mL vorlag. Da Makrophagen *L. pneumophila*-OMVs sehr schnell internalisieren (Jager *et al.* 2014) und nach 24 h Infektion nur noch ein Bruchteil der entstandenen OMVs frei im Überstand vorliegen sollte, wurden für alle nachfolgenden Experimente 0,1, 1 und 10 µg/mL OMVs zur Stimulation humaner Makrophagen eingesetzt.

Um die Reaktion der THP-1-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde ein Megaplex-ELISA durchgeführt um mehrere Zytokine simultan analysieren zu können. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Freisetzung von proinflammatorischem IL-6 (siehe Abbildung 1B) und antiinflammatorischem IL-10 (siehe Abbildung 1E). Die Abgabe von TNF-α (siehe Abbildung 1C) und IL-1β (siehe Abbildung 1D), beide proinflammatorisch, verhielt sich dosisabhängig.

L. pneumophila aktiviert Makrophagen über verschiedene membranständige Rezeptoren. Die Aktivierung von TLR5 erfolgt durch Flagellin (Hawn *et al.* 2007; Schmeck *et al.* 2007) und darüber hinaus aktiviert Legionellen-LPS TLR2 (Akamine *et al.* 2005; Shim *et al.* 2009). Da

OMVs LPS auf ihrer Oberfläche tragen, wurde getestet, ob Makrophagen auf *L. pneumophila*-OMVs in einer ähnlichen Weise reagieren wie auf die zugrundeliegenden Bakterien. Dazu wurden murine Makrophagen verwendet, welche aus präparierten Knochenmarkszellen genetisch veränderter Mäuse differenziert wurden (mBMDM). mBMDM von Wildtyp- und TLR2/4^{-/-}-Mäusen wurden gleichermaßen mit OMVs behandelt (0,1 und 1 µg/mL) und die Sekretion von CXCL1 gemessen, wobei es sich um ein murines funktionelles Homolog des humanen IL-8 handelt (Call *et al.* 2001). mBMDM von Wildtyp-Mäusen reagierten mit ansteigender CXCL1 Freisetzung, wohingegen die TLR2/4^{-/-}-Makrophagen nicht reagierten und die Sekretion von CXCL1 nahezu der von unbehandelten Kontrollzellen entsprach (siehe Abbildung 1F).

Die Ergebnisse zeigen, dass *L. pneumophila*-OMVs Makrophagen proinflammatorisch aktivieren können und dass diese Aktivierung über membranständige TLRs erfolgt.

2.2 Veränderung der bakteriellen Replikation

Anschließend wurde der Einfluss einer OMV-Vorbehandlung in THP-1-Zellen auf eine nachfolgende Infektion mit *L. pneumophila* untersucht. Makrophagen wurden mit verschiedenen OMV-Dosen für 20 h vorbehandelt, da die Zellen hier bereits eine robuste proinflammatorische Aktivierung zeigten, und anschließend mit Legionellen (MOI 0,5) infiziert. Um sowohl Unterschiede in der bakteriellen Aufnahme als auch der Replikation zu betrachten, wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten (2, 24 und 48 h) ein *colony forming unit* (CFU)-Assay durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten lysiert, die enthaltenen Bakterien so freigesetzt und Verdünnungen auf Agarplatten gegeben, um auf die vorhandene Legionellenzahl schließen zu können. Als Referenz dienten infizierte Zellen, die keine Vorbehandlung erhielten. Die Vorbehandlung mit LPS/IFN-γ wurde eingesetzt, um den klassischen, proinflammatorischen (M1) Phänotyp in Makrophagen zu induzieren. Diese Zellen sind in der Lage, die Replikation von *L. pneumophila* zu verhindern und diese abzutöten (Santic *et al.* 2005). Die Lyse der Makrophagen 2 h nach Infektion zeigte keine Unterschiede in der Aufnahme der Bakterien (siehe Abbildung 2A und Abbildung S2B). Die Vorbehandlung der Makrophagen mit LPS/IFN-γ führte zu einer Reduktion der bakteriellen Replikation 24 h nach Infektion (42 % Reduktion). Ähnlich verminderte Bakterienzahlen wiesen die OMV vorbehandelten Makrophagen auf. Die niedrigste OMV-Dosis führte zu einem 10-prozentigen Rückgang und die höheren Dosen zu einer Reduktion um 23 % beziehungsweise 33 %. Nach 48-stündiger Infektion war die bakterielle Last in LPS/IFN-γ vorbehandelten Makrophagen weiter gesunken (96 % Reduktion). Im Gegensatz dazu führte die OMV-

Vorbehandlung interessanterweise zu einer Verdopplung der *L. pneumophila*-Replikation zum späten Zeitpunkt der Infektion (48 h p.i.; 0,1 µg/mL OMVs: Anstieg um 88 %, 1 µg/mL OMVs: Anstieg um 119 %, 10 µg/mL: Anstieg um 118 %).

Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurden OMV vorbehandelte Makrophagen mit einer Legionellenmutante infiziert, die nicht in der Lage ist, Effektorproteine in das Wirtszytosol freizusetzen und somit nicht in der Lage ist, eine LCV aufzubauen (*L. pneumophila* ΔdotA) (Bartfeld *et al.* 2009; Hubber und Roy 2010). Die Infektion mit ΔdotA Legionellen nach OMV-Vorbehandlung führte zu einem Anstieg der Replikation zum späten Zeitpunkt der Infektion um den Faktor 14 im Vergleich zur alleinigen Infektion der Makrophagen (siehe Abbildung S2C). OMVs können also nicht nur die Replikation von Wildtyp-Legionellen fördern, sondern auch die Replikation einer eigentlich replikationsdefizienten Mutante ermöglichen.

Um den Anstieg der bakteriellen Replikation zu visualisieren, wurden Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt. THP-1-Zellen wurden mit und ohne OMV-Vorbehandlung mit *L. pneumophila* infiziert (MOI 0,5 für 48 h) und die fixierten Zellen mit einem Legionellen-spezifischen LPS-Antikörper gefärbt. Die nicht vorbehandelten Zellen wiesen im Schnitt ein bis zwei LPS-positive Vakuolen pro Zelle auf (siehe Abbildung 2B+C). Die OMV-Vorbehandlung führte jedoch dazu, dass die Makrophagen viele LPS-positive Vakuolen aufwiesen, die über das gesamte Zytoplasma verstreut in den Zellen vorlagen.

Die Experimente zeigten eine unveränderte Phagozytosekapazität der humanen Makrophagen nach OMV-Behandlung und einen Anstieg der bakteriellen Replikation, wenn die Zellen vor der Infektion mit OMVs inkubiert wurden.

2.3 Reduzierte Reaktion von Makrophagen auf die Infektion mit *L. pneumophila*

Um die veränderte Reaktion von Makrophagen auf die Infektion mit Legionellen weiter zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Marker für klassisch aktivierte Makrophagen (M1: IL-1β, TNF-α und IL-6) und alternativ aktivierte, antiinflammatorische Makrophagen (M2: CD206) untersucht. Die Expression dieser Marker gibt Aufschluss über den Aktivierungsstatus der Makrophagen und ermöglicht die Charakterisierung ihres Phänotyps. Nach Infektion werden Makrophagen transient aktiviert und bewegen sich zwischen diesen beiden Extremen (M1 und M2) (Benoit *et al.* 2008). Die Balance ist entscheidend für den Verlauf der Infektion mit *L. pneumophila*.

Die Infektion nicht vorbehandelter THP-1-Zellen führte zu einem Anstieg der Expression von IL-1 β (siehe Abbildung 3A). Die Vorbehandlung mit LPS/IFN- γ oder OMVs erhöhte die Expression von IL-1 β zum Zeitpunkt der Infektion (0 h p.i.), jedoch führte die zusätzliche Infektion mit *L. pneumophila* zu keinem weiteren Anstieg der mRNA-Expression. Lediglich mit der geringsten eingesetzten OMV Dosis (0,1 μ g/mL) war zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion ein geringer Anstieg zu beobachten. Ähnlich wie IL-1 β verhielten sich die Expressionen von den weiteren getesteten M1-Markern TNF- α (siehe Abbildung 3B) und IL-6 (siehe Abbildung 3C).

Die Infektion mit *L. pneumophila* resultierte in nicht vorbehandelten THP-1-Zellen in einer verminderten Expression von CD206 im Verlauf des Experiments (siehe Abbildung 3D). Die OMV-Behandlung führte zu einer Reduktion der CD206-Expression zum Zeitpunkt der Infektion, die vergleichbar war mit der von nicht vorbehandelten aber infizierten Zellen zum Zeitpunkt 48 h p.i.. Die Expression von CD206 in OMV vorbehandelten Zellen verhielt sich stabil im Verlauf der Infektion. Die Präexposition der Makrophagen mit LPS/IFN- γ reduzierte die Expression von CD206 ebenfalls. Hier nahm die mRNA im Verlauf der Infektion mit *L. pneumophila* jedoch weiter ab.

Diese Experimente zeigen, dass Makrophagen durch OMVs von *L. pneumophila* stark in Richtung M1 aktiviert werden und mit einer verminderten M1-Antwort auf die nachfolgende Infektion mit *L. pneumophila* reagieren.

2.4 Analyse der ursächlichen OMV Komponenten

In weiterführenden Experimenten sollte charakterisiert werden, welche OMV-Komponente für die beschriebene, veränderte Legionellenreplikation in Makrophagen ursächlich ist.

Da Legionellen-OMVs Flagellin enthalten können (Galka *et al.* 2008), das Makrophagen über TLR5 aktivieren kann (Schmeck *et al.* 2007), wurden OMVs von Legionellen generiert, die kein Flagellin exprimieren (*L. pneumophila* Δ flaA) und diese zur Vorbehandlung eingesetzt. Im Vergleich zwischen OMVs von Wildtyp-*L. pneumophila* und OMVs von Δ flaA *L. pneumophila* konnte kein Unterschied hinsichtlich der bakteriellen Replikation festgestellt werden (siehe Abbildung S4A). Beide führen gleichermaßen zu einem Anstieg der Legionellenreplikation zum Zeitpunkt 48 h p.i.. Daraufhin wurde der Einfluss der weiteren enthaltenen Proteine untersucht. Die OMV-Proteine wurden mittels Hitze denaturiert (65 °C für 5 Minuten), wobei LPS und Membran intakt bleiben (McCaig *et al.* 2013). THP-1-Zellen wurden mit erhitzten OMVs vorbehandelt und im Anschluss infiziert. Im CFU-Assay war das Ergebnis der Behandlung mit erhitzten OMVs vergleichbar mit dem der Behandlung mit unbehandelten OMVs; beide

sorgten gleichermaßen für eine Induktion der bakteriellen Replikation (siehe Abbildung S3A). Es konnte somit kein Einfluss von OMV-Proteinen auf die bakterielle Replikation in einer nachfolgenden Infektion nachgewiesen werden.

Da OMVs LPS auf ihrer Oberfläche tragen, wurde der LPS-Gehalt mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test bestimmt. *L. pneumophila*-OMVs enthielten 0,22 µg LPS pro 1 µg Protein. Legionellen-LPS weist eine einzigartige Struktur auf, welche nicht von TLR4, sondern TLR2 erkannt wird (Shim *et al.* 2009; Shevchuk *et al.* 2011). Der Einfluss dieser TLR-Aktivierung auf die bakterielle Replikation wurde weiter untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit Lipoteichonsäure-Präparationen (LTA) oder LPS von *Salmonella minnesota* (*S. minnesota*) vorbehandelt. Die Aktivierung von TLR2 über LTA-Präparationen oder TLR4 über *S. minnesota*-LPS führte dazu, dass die *L. pneumophila*-Replikation in THP-1-Zellen reduziert wurde und im Verlauf des Experiments weiter abnahm (LTA: 19 bzw. 39 % Reduktion, LPS: 12 bzw. 60 % Reduktion; siehe Abbildung S3B). Eine alleinige Aktivierung der membranständigen TLRs scheint also für sich genommen nicht ausreichend zu sein, um die Legionellenreplikation langfristig zu steigern.

Weiterhin wurden Experimente mit mBMDM durchgeführt. Es wurden Zellen von Wildtyp-Mäusen im Vergleich mit TLR2^{-/-} und TRIF/MyD88^{-/-} im CFU-Assay verwendet. Die Reaktion von Wildtyp-Zellen auf OMVs und eine nachfolgende Infektion mit *L. pneumophila* war vergleichbar mit der von THP-1-Zellen. Zum Zeitpunkt 48 h p.i. wiesen die Zellen eine 15-fach erhöhte Bakterienlast auf (siehe Abbildung S3G). Murine Makrophagen, welche nicht über TLR2 verfügten, wiesen eine signifikant geringere Bakterienlast auf. Hier fiel der Anstieg der Legionellenreplikation 4,2-fach geringer aus als in Wildtyp-Makrophagen. Um den Einfluss einer TLR-Signalübertragung generell zu testen, wurden Makrophagen von TRIF/MyD88^{-/-}-Mäusen verwendet. Diesen Zellen fehlen die zentralen Adaptermoleküle, um die Signale von den membranständigen und endosomalen TLRs weiterzuleiten (Kawai und Akira 2010). Die Präexposition und anschließende Infektion von TRIF/MyD88^{-/-}-mBMDM führte zum geringsten Anstieg der Legionellenreplikation nach OMV-Behandlung in Mausmakrophagen. Die Legionellenreplikation konnte durch OMV-Gabe lediglich verdoppelt werden. Im Vergleich zu Wildtyp-mBMDM fiel der Anstieg 7,5-fach geringer aus und im Vergleich mit TLR2^{-/-}-mBMDM 1,8-fach geringer. Ohne Aktivierung von TLR-Signalwegen durch OMVs scheinen Makrophagen nicht permissiver für eine nachfolgende Infektion mit Legionellen zu werden.

Da OMVs nicht nur LPS und Proteine sondern auch Nukleinsäuren enthalten (Ghosal *et al.* 2015; Sjöstrom *et al.* 2015), wurde deren Einfluss genauer untersucht. OMVs wurden entweder mit einer Kombination von RNase A und RNase III oder DNase behandelt. Dies

erfolgte jeweils mit oder ohne Triton X-100, um die Membranintegrität zu stören und die Nukleinsäuren zugänglich für die eingesetzten Enzyme zu machen. Die Behandlung von OMVs mit Triton X-100 führte dazu, dass diese die Makrophagen nicht mehr permissiv für die anschließende Legionelleninfektion machten. Sowohl zum Zeitpunkt 24 h p.i. als auch 48 h p.i. war die Replikation unverändert im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrollzellen (siehe Abbildung S4B). Mit RNasen oder DNase vorbehandelte OMVs veränderten die Replikation der Bakterien nicht. Die Kombination von Enzym mit Triton X-100 führte dazu, dass die Replikation sich vergleichbar zu der in Kontrollzellen verhielt. Die Membranintegrität der OMVs scheint ein entscheidender Faktor für die Stimulation der Makrophagen zu sein.

Die ausschließliche Aktivierung von TLR2 oder TLR4 scheint nicht ausreichend zu sein, um die Legionellenreplikation in THP-1-Zellen zu fördern. Ein Einfluss von Flagellin, Proteinen oder Nukleinsäuren konnte nicht nachgewiesen werden. Fehlte die initiale Aktivierung von TLR2 oder die Signaltransduktion über die Adaptermoleküle TRIF und MyD88, war die Legionellenreplikation jedoch signifikant reduziert. Des Weiteren weisen die Experimente darauf hin, dass die Form, in der die OMVs ihre Antigene präsentieren, entscheidend für die Fähigkeit sind, Makrophagen permissiv für eine anschließende Infektion mit Legionellen zu machen.

2.5 Untersuchung beteiligter Signalwege

Die bisher durchgeführten Experimente deuten auf eine Beteiligung der TLR-Signalwege in der Reaktion von Makrophagen auf *L. pneumophila*-OMVs hin. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein zentrales Protein dieser Signalwege (Kawai und Akira 2007) und wird durch eine *L. pneumophila*-Infektion schnell aktiviert (Hempstead und Isberg 2013). Folglich stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von NF- κ B auch nach OMV-Stimulation erfolgt, und ob dies mit der gesteigerten Replikation in Zusammenhang steht.

Zellfraktionierungsexperimente nach 30-minütiger OMV-Behandlung in THP-1-Zellen zeigten, dass die NF- κ B Untereinheit p65 sehr schnell in den Nukleus translozierte (siehe Abbildung S5). Daraufhin wurden Experimente mit einem niedermolekularen Inhibitor für den IKK-Komplex durchgeführt, welcher die Viabilität der Zellen nicht beeinflusste (siehe Abbildung S6). Die OMV-Behandlung der Zellen erfolgt mit und ohne IKK-Inhibitor. Die Inhibition von NF- κ B veränderte die Legionellenreplikation zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion nicht (siehe Abbildung 4A). Die Langzeitreplikation von Legionellen war jedoch beeinflusst; hier ging die Replikation um 68 % zurück. Die Kombination von OMVs mit dem IKK-Inhibitor resultierte ebenfalls in einer Veränderung der Legionellenreplikation. Nach 24-stündiger Infektion war die

Ergebnisse

Bakterienlast um 21 % erhöht, wohingegen sie zum späten Zeitpunkt der Infektion um 50 % reduziert war. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte keinerlei Einflüsse auf die Legionellenreplikation.

Im Nachfolgenden wurde der Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Expression der M1- und M2-Marker analysiert. Die Expression der M1-Marker (IL-1 β , TNF- α und IL-6) war zum Zeitpunkt der Infektion reduziert, wenn die OMV-Behandlung mit dem IKK-Inhibitor kombiniert wurde (siehe Abbildung 4B-D). Diese reduzierte Expression war außer für TNF- α nicht stabil im Verlauf der Infektion. Im Gegensatz dazu war CD206 verstärkt exprimiert, wenn die OMV-Gabe mit NF- κ B-Inhibition kombiniert wurde und nahm im Verlauf der Infektion ab (siehe Abbildung 4E).

Da NF- κ B nicht nur die Expression proinflammatorischer Gene induziert, sondern auch die Expression anti-apoptotischer Proteine, wurde das Überleben von mit Legionellen infizierten THP-1-Zellen mit und ohne OMV-Vorbehandlung untersucht. Im Verlauf der Infektion nahm der prozentuale Anteil lebender Zellen ab (siehe Abbildung S7A), da der Replikationszyklus der Legionellen in eukaryoten Zellen immer mit der Lyse der Wirtszelle endet (Abu-Zant *et al.* 2005). Die Vorbehandlung der Zellen mit OMVs hatte jedoch zur Folge, dass diese die Infektion dosisabhängig signifikant besser überlebten als nicht vorbehandelte Zellen. Die niedrigste OMV-Dosis führte zur Verdopplung der lebenden Zellen 48 h p.i. und die höchste Dosis sogar zu einer Verdreifachung.

Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurde die Genexpression eines anti-apoptotischen NF- κ B-Zielmoleküls untersucht. Die Expression von BCL2A1 wurde betrachtet, da bekannt ist, dass sie durch *L. pneumophila* induziert werden kann (Losick und Isberg 2006). Die Infektion von THP-1-Zellen führte zur transkriptionellen Induktion von BCL2A1 im Verlauf des Experiments (siehe Abbildung S7B). Die OMV-Behandlung erhöhte die Expression von BCL2A1 zum Zeitpunkt 0 h p.i. und führte zu einem leichten Anstieg im Verlauf des Experiments. Die vorbehandelten Zellen wiesen eine erhöhte Expression von BCL2A1 24 h nach Infektion im Vergleich zu direkt infizierten Zellen auf. Zum Zeitpunkt 48 h p.i. waren die Expressionen ähnlich stark.

Da die OMV-Behandlung von Makrophagen anti-apoptotische Moleküle induziert und die Zellen eine nachfolgende Infektion besser überleben, wurde überprüft, ob hierin der Schlüssel für die vermehrte Legionellenreplikation liegt. Um die OMV-Behandlung zu imitieren wurden THP-1-Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk behandelt, anschließend infiziert und dann die bakterielle Replikation mittels CFU-Assay untersucht. Die Behandlung der Zellen mit

dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk resultierte jedoch nicht in einer Veränderung der Legionellenreplikation in THP-1-Zellen (siehe Abbildung S7C).

Die durchgeführten Experimente legen nahe, dass es sich bei NF- κ B um ein zentrales Molekül für die erhöhte Permissivität gegenüber Legionellen in Makrophagen handelt. Die Induktion anti-apoptotischer Moleküle und der damit verbundene Überlebensvorteil scheinen jedoch nicht für die gesteigerte Legionellenreplikation verantwortlich zu sein.

Die starke Abhängigkeit der Legionellenreplikation von NF- κ B und die Aktivierung von TLR2 durch OMVs legen die Annahme nahe, dass die antiinflammatorische *microRNA*-146a (miR-146a) in die Reaktion von Makrophagen auf OMVs involviert sein könnte, da bereits gezeigt wurde, dass sie in Entzündungsprozessen eine Rolle spielt (Saba *et al.* 2014). Die Behandlung von THP-1-Zellen mit OMVs führte zu einer dosisabhängigen Induktion von miR-146a (siehe Abbildung 5A, 0,1 μ g/mL OMVs: 6-fach, 1 μ g/mL OMVs: 10-fach, 10 μ g/mL OMVs: 16-fach). LPS/INF- γ führte ebenso zu einer Induktion der miR-146a, ähnlich wie die niedrigste OMV-Dosis (5-fach). Die OMV-Vorbehandlung und eine nachfolgende Infektion führte jedoch zu einer viel stärkeren Expression der miR-146a. Die Infektion von nicht vorbehandelten THP-1-Zellen induzierte die miR-146a wesentlich schwächer (24 h p.i.: 2-fach, 48 h p.i.: 12-fach). Die Induktion von miR-146a konnte durch Blockierung des TLR2 mittels blockierender Antikörper oder Blockade von NF- κ B durch den IKK-Inhibitor vermindert werden (siehe Abbildung S8A). Nach 48-stündiger Infektion war die Expression von miR-146a nach Kombination von OMVs mit einem TLR2-blockierenden Antikörper 2,4-fach geringer und bei der Kombination mit dem IKK-Inhibitor 1,9-fach geringer als bei alleiniger OMV-Gabe. Darüber hinaus wiesen TLR2^{-/-}-mBMDM nach OMV-Behandlung eine signifikant verminderte miR-146a Expression im Vergleich zu Wildtyp-mBMDM Zellen auf (siehe Abbildung S8B). mBMDM von TRIF/MyD88^{-/-}-Mäusen reagierten gar nicht mit einem Anstieg miR-146a auf OMVs.

Die Expression des primären Transkripts von miR-146a (pri-mir-146a) ist NF- κ B-abhängig (Taganov *et al.* 2006). Alle bisher untersuchten NF- κ B-abhängigen M1-Marker wiesen nach einmaliger Induktion keinen weiteren Anstieg im Verlauf der Infektion auf (siehe Abbildung 3), daher stellte sich die Frage, ob es sich bei dem weiteren Anstieg von miR-146a um transkriptionelle Induktion oder Prozessierung bereits vorhandener pri-mir-146a handelte. Die Infektion von THP-1-Zellen führte zur vermehrten Transkription von pri-mir-146a (siehe Abbildung 5B). Die OMV-Behandlung von THP-1-Zellen führte zur dosisabhängigen Induktion von pri-mir-146a, jedoch konnte die nachfolgende Infektion der Zellen keinen weiteren Anstieg der Transkription hervorrufen, da die Höhe der pri-miR-146a-Expression im Verlauf der Infektion stabil blieb. LPS/INF- γ induzierte die Expression von pri-mir-146a ebenfalls. Auch hier

konnte kein weiterer Anstieg des primären Transkripts im Verlauf der Infektion beobachtet werden. Der in OMV-behandelten Makrophagen beobachtete Anstieg der reifen miR-146a nach Infektion mit *L. pneumophila* scheint also auf Prozessierung der bereits transkribierten pri-mir-146a und nicht auf weitere transkriptionelle Induktion zurückzuführen zu sein.

Die starke Expression der antiinflammatorischen miR-146a und die gleichzeitige Abhängigkeit von intakter TLR-NF- κ B-Signalübertragung deutet darauf hin, dass dieser Signalweg eine entscheidende Rolle für die Reaktion von Makrophagen auf OMVs von *L. pneumophila* spielt. Es ist beschrieben, dass die Expression von miR-146a die Replikation von Mykobakterien in Makrophagen verstärkt (Li *et al.* 2013). Da die hier durchgeführten Experimente eine starke miR-146a-Expression bei gleichzeitig gesteigerter bakterieller Replikation zeigten, sollte analysiert werden, ob die Expression der *microRNA* mit der bakteriellen Replikation verknüpft war. Hierzu wurde mittels Transfektion miR-146a in THP-1-Zellen entweder überexprimiert (*mimic*) oder herunterreguliert (*inhibitor*). Die Überexpression induzierte die miR-146a-Expression 500-fach und die Transfektion des Inhibitors verminderte die endogene Expression um 42 % (siehe Abbildung 5C). In CFU-Assays wurde der Einfluss der Expression von miR-146a auf die *L. pneumophila*-Replikation untersucht. Die Überexpression von miR-146a resultierte in einem etwa 27-prozentigen Anstieg der Legionellenreplikation zu beiden Zeitpunkten (siehe Abbildung 5D). Im Gegensatz dazu hatte die Transfektion des Inhibitors zur Folge, dass die bakterielle Replikation vermindert wurde (24 h p.i.: 11,4 % Reduktion, 48 h p.i.: 14,3 % Reduktion).

Die Aktivierung von TLR2 und die nachfolgende Signaltransduktion über NF- κ B scheint nach OMV-Behandlung in Makrophagen für die transkriptionelle Induktion von miR-146a verantwortlich zu sein. Der weitere Anstieg im Verlauf der Infektion erfolgt durch Prozessierung bereits vorhandener pri-mir-146a. Die Expression der antiinflammatorischen miR-146a beeinflusst die Replikation von *L. pneumophila*.

Ein gut charakterisiertes Zielmolekül von miR-146a ist die Kinase IRAK-1 (Hou *et al.* 2009; Saba *et al.* 2014). Nach TLR2-Aktivierung vermittelt IRAK-1 die nachfolgende intrazelluläre Signalübertragung. IRAK-1 wird phosphoryliert, polyubiquitiniert und anschließend degradiert (Flannery und Bowie 2010). Der untranslatierte Bereich im 3'-Ende (3' UTR) der IRAK-1 mRNA kann durch miR-146a gebunden werden, was die Translation der mRNA vermindert (Chassin *et al.* 2010). Die Analyse der Proteinexpression von IRAK-1 nach OMV-Stimulation von THP-1-Zellen zeigte, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion stark reduzierte IRAK-1 Proteinmenge aufwiesen (siehe Abbildung 6A). Die niedrigste OMV-Dosis reduzierte IRAK-1 um 30 %, 1 μ g/mL OMVs führten zu einer 70-prozentigen Abnahme von IRAK-1 und die höchste Dosis zu einer

Ergebnisse

Reduktion um 80 %. Die Infektion der vorbehandelten Zellen reduzierte die IRAK-1-Expression weiter als die alleinige Infektion der Makrophagen mit *L. pneumophila* (48 h p.i.; Infektion: 30 % IRAK-1, Kombination OMV mit Infektion: 10 % IRAK-1). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit LPS/IFN- γ zu einem Anstieg des IRAK-1-Proteins (0 h p.i.: 80 % Anstieg). Im Verlauf der Infektion wiesen diese Zellen stets eine höhere IRAK-1-Expression auf als OMV-behandelte Zellen.

Da THP-1-Zellen anders auf die Vorbehandlung mit LTA-Präparationen oder LPS reagierten als auf OMVs, wurden die Proteinmengen von IRAK-1 auch hier betrachtet. Die Stimulation mit diesen spezifischen, unbelebten TLR-Liganden hatte ebenfalls eine Reduktion von IRAK-1 zur Folge (siehe Abbildung S9C+D). Die Behandlung mit LTA-Präparationen führte zu einer Abnahme von IRAK-1 um 17 % und LPS-Gabe resultierte in einem 19-prozentigen Rückgang von IRAK-1. Mit zusätzlicher Infektion der Zellen ging das IRAK-1-Protein weiter zurück. Im Gegensatz dazu erzielten 10 μ g/mL OMVs einen Rückgang um 70 %, der über den Verlauf der Infektion stabil blieb.

Da eine längere Abwesenheit von IRAK-1 für die Legionellenreplikation von Vorteil zu sein scheint, wurden Experimente mit siRNA-vermitteltem *knockdown* von IRAK-1 durchgeführt. Die Transfektion von siIRAK-1 führte zu einer Abnahme der IRAK-1-Proteinexpression um 50 % im Vergleich zur Kontrolltransfektion (*scramble*, scr; siehe Abbildung 6B). Die Expression von IRAK-1 war im Verlauf des Experiments stabil. Nach 24-stündiger Infektion konnte keine Veränderung der Legionellen-Last in THP-1-Zellen mit und ohne siIRAK-1 nachgewiesen werden. Weitere 24 h später kam es zu einem Anstieg der Legionellenreplikation um 75 % in siIRAK-1 transfizierten Zellen im Vergleich zur scr-Kontrolle (siehe Abbildung 6C). Da es sich bei IRAK-1 um ein wichtiges Protein im TLR/IL-1R-Signalweg handelt, wurde die Expression von Makrophagen-Markern überprüft. Die Transfektion von siIRAK-1 und die nachfolgende Infektion mit *L. pneumophila* resultierte in einer verminderten Expression von IL-1 β , TNF- α und IL-6 im Vergleich zu scr-Kontrolle (siehe Abbildung 6D-F). Im Gegensatz dazu war die Expression des STAT6-abhängigen CD206 nicht durch die Transfektion von siIRAK-1 beeinflusst (siehe Abbildung 6G).

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Behandlung von Makrophagen mit *L. pneumophila*-OMVs zur TLR2-NF- κ B-vermittelten Expression von miR-146a führen. IRAK-1 wurde durch die TLR2-Aktivierung degradiert und seine Translation durch miR-146a gehemmt. Somit war IRAK-1 verlängert abwesend. Dies scheint für die Legionellenreplikation förderlich zu sein.

3 Diskussion

Um mit ihrer Umwelt in Kontakt zu treten sekretieren Bakterien verschiedenste Moleküle (Cambronne und Roy 2006). Sowohl eukaryote als auch prokaryote Zellen können Moleküle nicht nur frei ins extrazelluläre Milieu abgeben, sondern außerdem in Form extrazellulärer Vesikel. Die von gramnegativen Bakterien sezernierten Vesikel werden als *outer membrane vesicles* (OMV) bezeichnet. Sie werden von der äußeren Membran abgeschnürt, transportieren Endotoxin und verschiedenen bakterielle Antigene (Beveridge 1999). Sie sind daher potente proinflammatorische Mediatoren für verschiedene Zelltypen (Kuehn und Kesty 2005). *Acinetobacter baumannii*-OMVs aktivieren Epithelzellen, wodurch diese Zytokine freisetzen (Jun *et al.* 2013). Zusätzlich führen OMVs von *Clostridium perfringens* zur Stimulation von murinen Makrophagen (Jiang *et al.* 2014). *L. pneumophila*, ein Erreger schwerer, atypischer Pneumonien, produziert ebenfalls OMVs. Diese werden durch Alveolarmakrophagen aufgenommen und können humanes Lungengewebe schädigen (Jager *et al.* 2014). Die Mehrheit der bisher publizierten OMV-Studien beschäftigt sich mit dem Einfluss der bakteriellen Vesikel auf ihre Zielzelle oder ihr Zielgewebe. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von *L. pneumophila*-OMVs auf humane und murine Makrophagen und eine nachfolgende Infektion dieser Zellen mit *L. pneumophila* untersucht werden.

THP-1-Zellen reagierten bereits auf eine Exposition mit 0,01 µg/mL *L. pneumophila*-OMVs mit der Sekretion von IL-8. Die Reaktion der Makrophagen verhielt sich zeit- und dosisabhängig. Außerdem sekretierten die Zellen IL-1β, IL-6, IL-10 und TNF-α abhängig von der verwendeten OMV-Dosis. Die durch die OMVs hervorgerufene Reaktion ist vergleichbar mit der, die *L. pneumophila* hervorruft (Schmeck *et al.* 2007). Primäre humane Makrophagen reagieren auf 0,3 µg/mL *L. pneumophila*-OMVs mit der Freisetzung von TNF-α (Jager *et al.* 2014). Im Gegensatz zu Makrophagen benötigt eine Typ II-Pneumozyten-Zelllinie (A549) wesentlich höhere OMV-Dosen, um eine proinflammatorische Reaktion hervorzurufen (50 µg im Vergleich zu 0,01 µg/mL) (Galka *et al.* 2008). Um die *in vitro* Experimente den realen Infektionsbedingungen so gut wie möglich anzugleichen, wurden LPS-Messungen durchgeführt. Die mittels differentieller Ultrazentrifugation angereicherten vesikulären Strukturen aus Infektionsexperimenten wurden hinsichtlich ihres relativen LPS-Gehalts quantifiziert und die zur Stimulation verwendeten OMV-Mengen angepasst.

Da OMVs LPS auf ihrer Oberfläche tragen (Akamine *et al.* 2005; Shim *et al.* 2009), wurde der Einfluss von LPS auf die Aktivierung von Makrophagen durch OMVs untersucht. mBMDM von TLR2/4^{-/-}-Mäusen zeigten eine reduzierte CXCL1-Freisetzung im Vergleich zu mBMDM von

Wildtyp-Mäusen. Hierbei handelt es sich um ein funktionelles Homolog des humanen IL-8 (Call *et al.* 2001). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Jäger *et al.* überein, die zeigen konnten, dass HEK293-Zellen auf OMVs von *L. pneumophila* reagieren, wenn TLR2 überexprimiert wird (Jäger *et al.* 2014). LPS scheint also das wichtigste Stimulans auf *L. pneumophila*-OMVs zu sein.

Da *L. pneumophila*-OMVs das TLR5-aktivierende Flagellin enthalten können (Schmeck *et al.* 2007; Galka *et al.* 2008), wurde dessen Einfluss auf THP-1-Zellen untersucht. OMVs einer Flagellin-defizienten Legionellenmutante verhielten sich in Stimulationsexperimenten wie OMVs von Wildtyp-Legionellen.

Die Infektion von Makrophagen mit *L. pneumophila* führte zur Expression von Markern klassisch aktivierter Makrophagen (M1), welche hauptsächlich eine proinflammatorische Immunantwort induzieren. Wurden die Zellen hingegen vor der Infektion mit OMVs inkubiert, stieg die Expression dieser M1-Marker durch die Infektion nicht weiter an. Eine verminderte Reaktion von Makrophagen gegenüber klassischer TLR-Stimuli wurde auch nach Behandlung mit OMVs von *Brucella abortus* beobachtet. Hier sekretierten OMV-behandelte THP-1-Zellen weniger TNF- α und IL-8, wenn sie mit LPS, Pam3CSK4 oder Flagellin inkubiert wurden (Pollak *et al.* 2012). Für *Porphyromonas gingivalis*-OMVs ist ebenfalls beschrieben, dass sie die TNF- α -Reaktion auf einen zweiten LPS-Stimulus vermindern (Duncan *et al.* 2004).

L. pneumophila-OMV-Vorbehandlung veränderte die Phagozytose-Kapazität der Makrophagen bei einer nachfolgenden Infektion nicht. Jedoch war die Replikation von *L. pneumophila* nach 24-stündiger Infektion dosisabhängig reduziert. Im Gegensatz zur frühen Phase der Infektion, konnte nach einer längeren Infektion (48 h) eine vermehrte bakterielle Replikation in OMV vorbehandelten Makrophagen beobachtet werden. Ein vergleichbarer Effekt in der frühen Phase der Infektion wurde durch die Vorbehandlung der THP-1-Zellen mit LPS/IFN- γ erzielt. Hierbei handelt es sich um einen klassischen Aktivator für Makrophagen, es kommt zu vermehrtem Abtöten der Bakterien (Santic *et al.* 2005). Diese OMV-vermittelte Einschränkung der Legionellenreplikation scheint nicht von transportierten Nukleinsäuren oder Flagellin abzuhängen, welches durch Experimente mittels RNase und DNase Verdau von OMVs und OMVs von Δ flaA Legionellen gezeigt wurde. Jedoch zeigten sich sowohl die enthaltenen Proteine als auch TLR2-Liganden als relevant für den Rückgang der bakteriellen Replikation, da die Hitze-Exposition der OMVs den Effekt blockieren konnte, während eine TLR2-Aktivierung ihn nachahmen konnte. Darüber hinaus führte die Blockade des kanonischen NF- κ B-Signalwegs dazu, dass die initiale verminderte Replikation zum Zeitpunkt 48 h p.i. deutlich erhöht war. *L. pneumophila* ist von der Aktivierung anti-apoptotischer NF- κ B-Zielgene in den infizierten Makrophagen abhängig (Abu-Zant *et al.* 2005; Losick und Isberg 2006). Die vermehrte

Replikation in der späten Phase der Infektion (48 h p.i.) war sowohl in THP-1-Zellen als auch primären murinen Makrophagen zu beobachten. Interessanterweise konnten OMVs auch die Vermehrung von dot/icm-defizienten Legionellen verbessern. Diese Mutanten sind nicht in der Lage, eine LCV in Makrophagen auszubilden und werden daher lysosomal degradiert (Bartfeld *et al.* 2009; Hubber und Roy 2010). Für *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)-OMVs ist beschrieben, dass diese die bakterielle Replikation *in vivo* verstärken (Prados-Rosales *et al.* 2011). Die OMV-Gabe vor einer Infektion verdoppelte die bakterielle Last in der Lunge der Mäuse und führte zu einer vermehrten Ausbreitung der Bakterien in die Milz. Die gesteigerte Legionellenreplikation in der späten Phase der Infektion scheint nicht mit Flagellin, den weiteren transportierten Proteinen oder Nukleinsäuren zusammenzuhängen. Der beobachtete Effekt konnte nicht durch LPS- oder LTA-Gabe nachempfunden werden. In mBMDM ohne membranständigen TLR2 oder die Adaptermoleküle TRIF und MyD88 konnte die vermehrte Replikation nicht beobachtet werden. Ebenso führte die gleichzeitige Inkubation der Makrophagen mit einem IKK-Inhibitor zum Verlust der bakteriellen Replikation. Zudem konnte die gesteigerte Replikation durch Störung der OMV-Membranintegrität aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur LPS auf der OMV-Oberfläche die Makrophagen aktiviert, sondern dass auch die Form und der Kontext, in dem es den Makrophagen präsentiert wird, ausschlaggebend sind. Ellis *et al.* haben ähnliche Beobachtungen für *Pseudomonas aeruginosa* OMVs beschrieben (Ellis *et al.* 2010). LPS ist wichtig für die Bindung der OMVs an die Makrophagenoberfläche und Proteine sind essentiell für die Internalisierung der OMVs. Diese beiden Komponenten werden benötigt, um das volle Spektrum der Makrophagenaktivierung hervorzurufen. Die Beobachtung, dass die LPS-Aggregatgröße dessen Aufnahme beeinflusst (Kitchens und Munford 1998) und dass vesikuläres LPS Makrophagen potenter aktiviert als nicht-vesikuläres (Ellis *et al.* 2010), unterstützt die Hypothese, dass die dreidimensionale Struktur der Vesikel ausschlaggebend und für die nachfolgende Makrophagenreaktion entscheidend ist. Die hier beschriebenen Ergebnisse unterstützen das Modell, dass die Reaktion von Immunzellen vom Kontext abhängt, in dem LPS präsentiert wird (Elsbach 2000).

L. pneumophila ist davon abhängig, eine feine Balance zwischen Immunreaktion und erfolgreicher Infektion zu schaffen. Die Infektion induziert die nukleäre Translokation von p65 und somit sowohl proinflammatorische Zytokine als auch anti-apoptotische Proteine (Losick und Isberg 2006; Schmeck *et al.* 2007). OMVs induzieren ebenfalls die Translokation von p65 in den Nukleus. *L. pneumophila* besitzt Serin/Threonin-Kinasen, die den NF- κ B-Inhibitor I κ B α an den Serinen 36 und 52 phosphorylieren können, was zu dessen Polyubiquitinierung und anschließenden Degradation führt. Die Legionellen-Kinasen LnaB und LegK1 führen so zu einer IKK-unabhängigen Translokation von NF- κ B in den Nukleus und folglich zu einer robusten

Aktivierung von anti-apoptotischen und proinflammatorischen Genen (Ge *et al.* 2009; Losick *et al.* 2010). Da *L. pneumophila* selbst den NF- κ B-Signalweg aktivieren kann, und, wie im CFU-Assay mit dem IKK-Inhibitor gezeigt, entscheidend von der Aktivierung dieses Signalwegs abhängt, legt dies die Hypothese nahe, dass Makrophagen eine bessere Replikationsnische für Legionellen darstellen, wenn der NF- κ B-Signalweg bereits vor der Infektion aktiviert wurde. Neben NF- κ B sind aber auch die Signalwege über SAPK/JNK und die p38 MAP-Kinase wichtig für die Legionellenreplikation (Welsh *et al.* 2004). Diese beiden Signalwege sind auch nach IKK-Inhibitor-Gabe intakt, ihre Beteiligung wurde hier aber nicht untersucht.

Zu einem späten Zeitpunkt der Infektion (48 h p.i.) konnte ein besseres Überleben der Makrophagen beobachtet werden. Dies resultiert vermutlich aus dem aktivierten NF- κ B-Signalweg und dem damit einhergehenden Anstieg der anti-apoptotischen Faktoren wie BCL2A1. Dieses BCL2 Familienmitglied kann durch GM-CSF, LPS oder TNF- α NF- κ B-abhängig induziert werden (Orlofsky *et al.* 1991; Lin *et al.* 1993; Karsan *et al.* 1996; Zong *et al.* 1999). Der Überlebensvorteil OMV-vorbehandelter Makrophagen in einer nachfolgenden Legionelleninfektion ist im Einklang mit der Expression von BCL2A1. Die vermehrte bakterielle Replikation konnte jedoch nicht mit dem besseren Überleben der Makrophagen in Verbindung gebracht werden, da die Blockade von Caspasen nicht zu einer gesteigerten Replikation der Legionellen führte. Der Replikationszyklus von Legionellen in eukaryoten Zellen endet mit der Induktion der Apoptose der Wirtszellen und ermöglicht so den Austritt der Bakterien aus der absterbenden Zelle (Muller *et al.* 1996; Abu-Zant *et al.* 2005). Hier wurde jedoch ein Anstieg der bakteriellen Replikation bei gleichzeitig verbessertem Überleben der Makrophagen beobachtet. Die Immunfluoreszenzexperimente zeigten einen Anstieg der Vakuolenanzahl pro Zelle, was den Anstieg der Replikation bei verbessertem Überleben erklären kann. Eine OMV-Vorbehandlung scheint Makrophagen empfänglicher für eine nachfolgende Infektion mit Legionellen und deren interzelluläre Replikation zu machen.

Bei der TLR-bedingten NF- κ B-Aktivierung handelt es sich um einen streng regulierten Signalweg. Die Regulation erfolgt nicht nur auf posttranslationaler Ebene der Proteine, sondern auch über miRNAs, die die mRNA-Stabilität involvierter Proteine beeinflussen (Ma *et al.* 2011). Durch Inkubation mit *L. pneumophila*-OMVs stieg die Expression von miR-146a durch transkriptionelle Induktion über TLR2 und NF- κ B stark an. Diese antiinflammatorische miRNA kann die intrazelluläre Replikation von *M. bovis* in Makrophagen regulieren (Li *et al.* 2013). Hier konnte gezeigt werden, dass die artifizielle Überexpression von miR-146a die Replikation von *L. pneumophila* ebenfalls verstärkte, wohingegen der *knockdown* in einer verminderten Replikation resultierte. Die Transfektion des miR-146a-Inhibitors zeigte schwächere Effekte, da

ein funktioneller *knockdown* einer so stark exprimierten miRNA schwer zu erzielen ist. Des Weiteren wurde ein Summensignal gemessen, das aus unterschiedlich effizient transfizierten Zellen entsteht. Es ist bekannt, dass die Transfektion von miRNAs die Beladung endogener miRNAs in die miRNA-Prozessierungs-Maschinerie beeinflussen kann (Khan *et al.* 2009). Dies könnte wiederum Ziel-mRNAs beeinflussen, die hier nicht untersucht wurden.

Die gesteigerte bakterielle Replikation von *M. bovis* nach miR-146a-Überexpression wurde mit IRAK-1 in Verbindung gebracht, bei dem es sich um ein gut charakterisiertes Zielmolekül von miR-146a handelt (Li *et al.* 2013). IRAK-1 ist eine wichtige Kinase in der Übertragung von TLR- und IL-1R-Signalen in der Zelle, da es die Aktivierung von NF- κ B vermittelt (Flannery und Bowie 2010). Da nach OMV-Stimulation sowohl die Kerntranslokation der NF- κ B Untereinheit p65 als auch eine lang anhaltende IRAK-1-Degradation beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob dies mit der vermehrten Replikation der Legionellen zusammenhängt. Zellen mit reduzierter IRAK-1-Expression, vermittelt durch siRNA-Transfektion, zeigten eine vermehrte Legionellenreplikation. Die Behandlung mit OMVs führte zu einem stärkeren Effekt auf die Replikation von *L. pneumophila*, vermutlich da der *knockdown* zu einem weniger starken Verlust von IRAK-1 auf Proteinebene führte als die OMV-Behandlung. In siIRAK-1-transfizierten Zellen waren Marker für klassisch aktivierte Makrophagen reduziert, ähnlich wie nach OMV-Stimulation. Es ist bekannt, dass LPS Zellen gegenüber einem zweiten TLR-Stimulus desensibilisieren kann, da es zur Degradation von IRAK-1 und zur Expression von miR-146a kommt und die Translation von IRAK-1 somit reprimiert wird. Dies resultiert darüber hinaus in einer verminderten Zytokinantwort auf einen zweiten LPS-Stimulus (Nahid *et al.* 2009). Die alleinige Aktivierung von TLR2 oder TLR4 war hier jedoch nicht in der Lage, das volle Repertoire an OMV-Reaktionen zu imitieren. Obwohl vergleichbare LPS-Mengen zur Stimulation verwendet wurden (1 μ g OMVs enthielten 220 ng LPS; es wurden 200 ng/mL *S. minnesota*-LPS eingesetzt), war die Reaktion der Makrophagen auf OMVs stärker. Da nach LTA- oder LPS-Gabe noch wesentlich höhere verbleibende IRAK-1-Mengen zum Zeitpunkt der Legionelleninfektion in den Makrophagen nachzuweisen waren als nach OMV-Gabe, kann dies die unterschiedlichen Replikationsbefunde erklären. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Stimuli (OMVs, LPS, LTA) induzierte die kombinierte Stimulation der Makrophagen mit LPS und IFN- γ die Proteinexpression von IRAK-1 sogar. Die Makrophagen waren hier klassisch aktiviert, was zur Folge hatte, dass die Legionellen deutlich schlechter replizierten als in nicht-vorbehandelten Kontrollzellen, da die Makrophagen in der Lage waren die Bakterien lysosomal zu degradieren (Santic *et al.* 2005).

Die Beobachtung, dass *L. pneumophila*-OMVs die Replikation von Legionellen beeinflussen, wurde bisher noch nicht beschrieben. Legionellen verfügen über viele ausgeklügelte Strategien, um ihre Replikation und Verbreitung zu ermöglichen und dem Immunsystem zu entkommen. Sie verändern zelluläre Signalwege, um der lysosomalen Degradation nach ihrer Phagozytose zu entkommen, sie verändern den vesikulären Transport, Ubiquitinierung und Autophagieprozesse der infizierten Zelle (Hubber und Roy 2010; Joshi und Swanson 2011; Kubori und Nagai 2011). So können sie die Oberhand über die angeborene Immunantwort des Wirts gewinnen. Die Aktivierung von NF- κ B durch *L. pneumophila* oder deren OMVs führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die sehr wahrscheinlich neue potentielle Wirtszellen zum Ort der Infektion locken. Die gesteigerte Infektion von Makrophagen in der Gegenwart von OMVs kann also ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus von *L. pneumophila* sein.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich *in vitro* Experimente durchgeführt. Die verwendete THP-1-Zelllinie wurde von einem einjährigen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen und *in vitro* differenziert (Chanput *et al.* 2014). Die Verwendung einer Zelllinie für die komplexen Infektionsexperimente war erforderlich, da sich diese leicht kultivieren lässt und sie mittels Transfektion modifizierbar ist. Darüber hinaus wurden aber auch primäre murine Makrophagen verwendet, die aus Knochenmarksvorläuferzellen differenziert wurden. Diese Zellen waren limitiert und konnten so nur für ausgewählte Experimente verwendet werden. Da genetische *knockouts* für wichtige TLR-Signalmoleküle verfügbar waren, wurden diese Makrophagen eingesetzt. Weiterführende Experimente könnten in primären humanen Alveolarmakrophagen durchgeführt werden, die sich von anderen Subtypen hinsichtlich ihres Phänotyps unterscheiden (Hussell und Bell 2014), aber in ihrer Verfügbarkeit stark limitiert sind und schwer zu manipulieren sind.

Es bleibt zu klären, welche Reaktionen *L. pneumophila*-OMVs *in vivo* hervorrufen. Der Einfluss der Vesikel auf ausgewählte Zielzellen wurde untersucht, jedoch bleibt die Frage offen, ob die Reaktionen im komplexen Lungengewebe vergleichbar ausfallen. Hier finden sich neben Alveolarmakrophagen vor allem Alveolarepithelzellen, die eine physiologische Barriere für Mikroorganismen darstellen und den Gasaustausch gewährleisten (Ward und Nicholas 1984). Das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen und ihre interzelluläre Kommunikation sollte untersucht werden.

Des Weiteren ist zu prüfen, welche OMV-Mengen *in vivo* unter Infektionsbedingungen freigesetzt werden. Es könnten Proben aus einer bronchoalveolären Lavage (BAL) von

infizierten Mäusen auf ihren OMV-Gehalt untersucht werden. Außerdem wäre es möglich, in einer zu diagnostischen Zwecken durchgeführten BAL beim Menschen OMVs zu quantifizieren.

Die präsentierten Ergebnisse in Kombination mit den zitierten Studien deuten auf eine immunmodulatorische Aktivität von OMVs hin, die den Bakterien helfen könnte, dem Wirts-Immunsystem zu entkommen. Es ist bekannt, dass Makrophagen *in vitro* tolerant gegenüber TLR-Stimuli werden können. Dies erfolgt vor allem bei hohen Dosen von TLR-Liganden (Foster *et al.* 2007; El Gazzar *et al.* 2010; McCall *et al.* 2011). *L. pneumophila*-OMVs können diese Toleranz ebenfalls hervorrufen, wie durch die fehlende Induktion der Zytokine nach Legionelleninfektion gezeigt wurde. Toleranz und Kreuztoleranz sind jedoch kein ausschließliches *in vitro*-Phänomen. Klinische Relevanz hat dies etwa bei Patienten mit septischem Schock, bei dem es zur Immunparalyse kommen kann (Biswas und Lopez-Collazo 2009). Diese Befunde sind wichtige Themen der Makrophagen-Forschung, welche sich aktuell nicht nur mit der Toleranzentwicklung sondern auch mit dem Immuntraining befasst. Training beschreibt die Beobachtung, dass Monozyten auch noch Tage nach einem ersten, subinflammatorischen TLR- oder NLR-Stimulus sehr viel stärker auf einen nachfolgenden Stimulus reagieren (Ifrim *et al.* 2014). Es ist bekannt, dass die Aktivierung der Monozyten über JNK- und p38-Signalwege erfolgt und es zusätzlich zu Veränderungen auf Chromatinebene kommt. Die Promotoren inflammatorischer Gene werden an Lysin 4 des Histons H3 trimethyliert, was eine schnelle Expression dieser Gene ermöglicht (Quintin *et al.* 2012).

Ein solches Training von Monozyten wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Beschreibungen, dass niedrige LPS-Dosen Mäuse vor septischem Schock schützen können (Kopanakis *et al.* 2013) und dass eine Art Vakzinierung in *SCID*-Mäusen so möglich ist (Kleinnijenhuis *et al.* 2012). Andererseits wurde beobachtet, dass eine LPS-Vorbehandlung die Mortalität in Mäusen in Modellen für septischen Schock erhöhen kann (Chen *et al.* 2015). Es wurden jedoch in allen bisherigen Studien nur pure TLR-Stimuli eingesetzt. Es wäre denkbar, dass OMVs durch ihre spezifische Kombination der verschiedensten TLR- und NLR-Liganden Immuntraining hervorrufen können.

Wenn OMVs Mäusen intranasal appliziert würden, könnte der Einfluss auf Alveolarmakrophagen *in vivo* untersucht werden. Je nach Dosis der eingesetzten OMVs könnten Toleranz oder Training induziert werden. Hier wäre zu klären, wie sich eine nachfolgende Infektion mit Legionellen auswirkt. Bei der Induktion von Toleranz wäre ein Anstieg der bakteriellen Replikation auch *in vivo* zu erwarten. Dies wurde bereits für OMVs von *M. bovis* beschrieben (Prados-Rosales *et al.* 2011). Käme es jedoch durch die OMV-Exposition zum Training der Alveolarmakrophagen, könnte eine nachfolgende Legionelleninfektion

schneller bekämpft werden. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine würde schneller erfolgen, was die Rekrutierung von Immunzellen bewirken würde. So könnte die Infektion direkt bekämpft werden. Eine überschießende und langanhaltende Immunantwort, die zur Gewebeschädigung führen kann (Medzhitov *et al.* 2012), würde verhindert. Eine schnellere Beseitigung der Infektion durch trainierte Makrophagen würde die Rekrutierung von Neutrophilen reduzieren und so das Gewebe weniger durch Neutrophile Elastase geschädigt, wie bereits für Infektionen der Lunge mit verschiedenen *Burkholderia* Spezies gezeigt werden konnte (Sahoo *et al.* 2014). Das Lungenepithel könnte so geschützt werden und die Organfunktion gewährleistet bleiben.

Würden Mäuse hingegen nicht nur intranasal sondern auch intravenös mit OMVs behandelt, könnte neben der lokalen Immunität über trainierte Alveolarmakrophagen auch eine systemische, adaptive Immunantwort hervorgerufen werden. Die Möglichkeit der Immunisierung durch OMVs ist bereits für *Neisseria meningitidis*-OMVs beschrieben (Oster *et al.* 2005), hier werden bereits Impfstoffe in klinischen Studien getestet (O’Ryan *et al.* 2014). Eine *L. pneumophila*-Infektion kann in Mäusen und Meerschweinchen eine adaptive Immunantwort auslösen (Blander *et al.* 1989; Joller *et al.* 2007). Daher ist es denkbar, dass *L. pneumophila*-OMVs dies aufgrund ihrer ähnlichen Antigenstrukturen ebenfalls können. In Meerschweinchen konnte sogar gezeigt werden, dass Legionellen-Kulturüberstand, welche OMVs enthält, eine Vakzinierung hervorrufen kann (Blander und Horwitz 1991).

L. pneumophila-OMVs sind bereits hinsichtlich ihres Proteingehalts charakterisiert (Galka *et al.* 2008), jedoch können OMVs auch DNA (Hagemann *et al.* 2014) und RNA (Ghosal *et al.* 2015) enthalten. Durch Sequenzierung könnten die enthaltenen Nukleinsäuren analysiert werden. Bakterielle RNAs können nicht nur endosomale TLRs aktivieren und so proinflammatorisch wirken (Eberle *et al.* 2009; Eigenbrod *et al.* 2012). Die Tatsache, dass virale miRNAs Säuger-mRNAs regulieren können (Liang *et al.* 2012), macht eine Interaktion zwischen bakteriellen sRNAs und Säuger-mRNAs denkbar. Die kleinen RNAs in extrazellulären Vesikeln von *Heligmosomoides polygyrus* sind beispielsweise in der Lage, die Wirts-Immunantwort zu dämpfen. Dies erfolgt über RNA-Interferenz zwischen einer Nematoden-miRNA und murinen mRNAs (Buck *et al.* 2014). Da die Möglichkeit der Reich-übergreifenden RNA-Interferenz durch sRNAs besteht, könnte in der Zukunft untersucht werden, ob OMV-übertragene sRNAs einen Einfluss auf Wirts-mRNAs haben.

Die *in vitro* und *in vivo* gewonnen Erkenntnisse können zukünftig neue molekulare Mechanismen der Legionelleninfektion aufdecken und so möglicherweise der Entwicklung neuer spezifischer Medikamente oder Impfstoffe dienen.

Diskussion

Insgesamt konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass OMVs direkt den Verlauf einer *L. pneumophila*-Infektion beeinflussen, indem sie Makrophagen proinflammatorisch aktivieren und gleichermaßen die bakterielle Replikation verbessern. Diese Eigenschaft scheint mit der TLR2- und NF- κ B-abhängigen Expression von miR-146a und der daraus resultierenden langen Abwesenheit von IRAK-1 verknüpft zu sein. So können OMVs die Replikation von *L. pneumophila* unterstützen und möglicherweise die Ausbreitung der Bakterien in der humanen Lunge ermöglichen.

4 Literaturverzeichnis

Abu-Zant, A., M. Santic, M. Molmeret, S. Jones, J. Helbig und Y. Abu Kwaik (2005). "Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*." *Infect Immun* 73(9): 5339-5349.

Akamine, M., F. Higa, N. Arakaki, K. Kawakami, K. Takeda, S. Akira und A. Saito (2005). "Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*." *Infect Immun* 73(1): 352-361.

Alaniz, R. C., B. L. Deatherage, J. C. Lara und B. T. Cookson (2007). "Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo." *J Immunol* 179(11): 7692-7701.

Alvarez-Martinez, C. E. und P. J. Christie (2009). "Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems." *Microbiol Mol Biol Rev* 73(4): 775-808.

Bartfeld, S., C. Engels, B. Bauer, P. Aurass, A. Flieger, H. Bruggemann und T. F. Meyer (2009). "Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by *Legionella pneumophila*." *Cell Microbiol* 11(11): 1638-1651.

Benoit, M., B. Desnues und J. L. Mege (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." *J Immunol* 181(6): 3733-3739.

Berger, K. H., J. J. Merriam und R. R. Isberg (1994). "Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene." *Mol Microbiol* 14(4): 809-822.

Beveridge, T. J. (1999). "Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles." *J Bacteriol* 181(16): 4725-4733.

Biswas, S. K. und E. Lopez-Collazo (2009). "Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance." *Trends Immunol* 30(10): 475-487.

Blander, S. J., R. F. Breiman und M. A. Horwitz (1989). "A live avirulent mutant *Legionella pneumophila* vaccine induces protective immunity against lethal aerosol challenge." *J Clin Invest* 83(3): 810-815.

Blander, S. J. und M. A. Horwitz (1991). "Vaccination with the major secretory protein of *Legionella* induces humoral and cell-mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*." *J Immunol* 147(1): 285-291.

Bonnington, K. E. und M. J. Kuehn (2014). "Protein selection and export via outer membrane vesicles." *Biochim Biophys Acta* 1843(8): 1612-1619.

Brenner, D. J., A. G. Steigerwalt und J. E. McDade (1979). "Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova." *Ann Intern Med* 90(4): 656-658.

Buck, A. H., G. Coakley, F. Simbari, H. J. McSorley, J. F. Quintana, T. Le Bihan, S. Kumar, C. Abreu-Goodger, M. Lear, Y. Harcus, A. Ceroni, S. A. Babayan, M. Blaxter, A. Ivens und R. M. Maizels (2014). "Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity." *Nat Commun* 5: 5488.

Buttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* 76(2): 262-310.

Call, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. R. Bolgos, D. E. Newcomb, G. K. Wollenberg und D. G. Remick (2001). "Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2." *Shock* 15(4): 278-284.

Cambronne, E. D. und C. R. Roy (2006). "Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems." *Traffic* 7(8): 929-939.

Chanput, W., J. J. Mes und H. J. Wichers (2014). "THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach." *Int Immunopharmacol* 23(1): 37-45.

Chassin, C., M. Kocur, J. Pott, C. U. Duerr, D. Gutle, M. Lotz und M. W. Hornef (2010). "miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine." *Cell Host Microbe* 8(4): 358-368.

Chen, K., S. Geng, R. Yuan, N. Diao, Z. Upchurch und L. Li (2015). "Super-low dose endotoxin pre-conditioning exacerbates sepsis mortality." *EBioMedicine* 2(4): 324-333.

Chi, B., M. Qi und H. K. Kuramitsu (2003). "Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration." *Res Microbiol* 154(9): 637-643.

Choi, D. S., D. K. Kim, S. J. Choi, J. Lee, J. P. Choi, S. Rho, S. H. Park, Y. K. Kim, D. Hwang und Y. S. Gho (2011). "Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*." *Proteomics* 11(16): 3424-3429.

Correia, A. M., J. S. Ferreira, V. Borges, A. Nunes, B. Gomes, R. Capucho, J. Goncalves, D. M. Antunes, S. Almeida, A. Mendes, M. Guerreiro, D. A. Sampaio, L. Vieira, J. Machado, M. J. Simoes, P. Goncalves und J. P. Gomes (2016). "Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease." *N Engl J Med* 374(5): 497-498.

Costa, T. R., C. Felisberto-Rodrigues, A. Meir, M. S. Prevost, A. Redzej, M. Trokter und G. Waksman (2015). "Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights." *Nat Rev Microbiol* 13(6): 343-359.

DebRoy, S., J. Dao, M. Soderberg, O. Rossier und N. P. Cianciotto (2006). "*Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19146-19151.

Devoe, I. W. und J. E. Gilchrist (1973). "Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*." *J Exp Med* 138(5): 1156-1167.

Dorward, D. W., T. G. Schwan und C. F. Garon (1991). "Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans." *J Clin Microbiol* 29(6): 1162-1170.

Duncan, L., M. Yoshioka, F. Chandad und D. Grenier (2004). "Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles." *Microb Pathog* 36(6): 319-325.

Eberle, F., M. Sirin, M. Binder und A. H. Dalpke (2009). "Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors." *Eur J Immunol* 39(9): 2537-2547.

Eddy, J. L., L. M. Gielda, A. J. Caulfield, S. M. Rangel und W. W. Lathem (2014). "Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*." *PLoS One* 9(9): e107002.

Eigenbrod, T., L. Franchi, R. Munoz-Planillo, C. J. Kirschning, M. A. Freudenberg, G. Nunez und A. Dalpke (2012). "Bacterial RNA mediates activation of caspase-1 and IL-1 β release

independently of TLRs 3, 7, 9 and TRIF but is dependent on UNC93B." *J Immunol* 189(1): 328-336.

El Gazzar, M., T. Liu, B. K. Yoza und C. E. McCall (2010). "Dynamic and selective nucleosome repositioning during endotoxin tolerance." *J Biol Chem* 285(2): 1259-1271.

Ellis, T. N. und M. J. Kuehn (2010). "Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles." *Microbiol Mol Biol Rev* 74(1): 81-94.

Ellis, T. N., S. A. Leiman und M. J. Kuehn (2010). "Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components." *Infect Immun* 78(9): 3822-3831.

Elsbach, P. (2000). "Mechanisms of disposal of bacterial lipopolysaccharides by animal hosts." *Microbes Infect* 2(10): 1171-1180.

Falco, V., T. Fernandez de Sevilla, J. Alegre, A. Ferrer und J. M. Martinez Vazquez (1991). "*Legionella pneumophila*. A cause of severe community-acquired pneumonia." *Chest* 100(4): 1007-1011.

Fernandez-Moreira, E., J. H. Helbig und M. S. Swanson (2006). "Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes." *Infect Immun* 74(6): 3285-3295.

Flannery, S. und A. G. Bowie (2010). "The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling." *Biochem Pharmacol* 80(12): 1981-1991.

Foster, S. L., D. C. Hargreaves und R. Medzhitov (2007). "Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications." *Nature* 447(7147): 972-978.

Fulsundar, S., K. Harms, G. E. Flaten, P. J. Johnsen, B. A. Chopade und K. M. Nielsen (2014). "Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation." *Appl Environ Microbiol* 80(11): 3469-3483.

Galka, F., S. N. Wai, H. Kusch, S. Engelmann, M. Hecker, B. Schmeck, S. Hippenstiel, B. E. Uhlin und M. Steinert (2008). "Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles." *Infect Immun* 76(5): 1825-1836.

Gamazo, C. und I. Moriyon (1987). "Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells." *Infect Immun* 55(3): 609-615.

Ge, J., H. Xu, T. Li, Y. Zhou, Z. Zhang, S. Li, L. Liu und F. Shao (2009). "A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13725-13730.

Ghosal, A., B. B. Upadhyaya, J. V. Fritz, A. Heintz-Buschart, M. S. Desai, D. Yusuf, D. Huang, A. Baumuratov, K. Wang, D. Galas und P. Wilmes (2015). "The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*." *Microbiologyopen*.

Hagemann, S., L. Stoger, M. Kappelman, I. Hassl, A. Ellinger und B. Velimirov (2014). "DNA-bearing membrane vesicles produced by *Ahrensia kielensis* and *Pseudoalteromonas marina*." *J Basic Microbiol* 54(10): 1062-1072.

Hawn, T. R., W. R. Berrington, I. A. Smith, S. Uematsu, S. Akira, A. Aderem, K. D. Smith und S. J. Skerrett (2007). "Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*." *J Immunol* 179(10): 6981-6987.

Hempstead, A. D. und R. R. Isberg (2013). "Host signal transduction and protein kinases implicated in *Legionella* infection." *Curr Top Microbiol Immunol* 376: 249-269.

Ho, B. T., T. G. Dong und J. J. Mekalanos (2014). "A view to a kill: the bacterial type VI secretion system." *Cell Host Microbe* 15(1): 9-21.

Horstman, A. L. und M. J. Kuehn (2000). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles." *J Biol Chem* 275(17): 12489-12496.

Hou, J., P. Wang, L. Lin, X. Liu, F. Ma, H. An, Z. Wang und X. Cao (2009). "MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2." *J Immunol* 183(3): 2150-2158.

Hubber, A. und C. R. Roy (2010). "Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors." *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 261-283.

Hussell, T. und T. J. Bell (2014). "Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context." *Nat Rev Immunol* 14(2): 81-93.

Ifrim, D. C., J. Quintin, L. A. Joosten, C. Jacobs, T. Jansen, L. Jacobs, N. A. Gow, D. L. Williams, J. W. van der Meer und M. G. Netea (2014). "Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors." *Clin Vaccine Immunol* 21(4): 534-545.

Isberg, R. R., T. J. O'Connor und M. Heidtman (2009). "The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells." *Nat Rev Microbiol* 7(1): 13-24.

Ismail, S., M. B. Hampton und J. I. Keenan (2003). "*Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells." *Infect Immun* 71(10): 5670-5675.

Jager, J., S. Keese, M. Roessle, M. Steinert und A. B. Schromm (2014). "Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes." *Cell Microbiol*.

Jager, J., S. Marwitz, J. Tiefenau, J. Rasch, O. Shevchuk, C. Kugler, T. Goldmann und M. Steinert (2014). "Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections." *Infect Immun* 82(1): 275-285.

Jiang, Y., Q. Kong, K. L. Roland und R. Curtiss, 3rd (2014). "Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity." *Int J Med Microbiol* 304(3-4): 431-443.

Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee und J. O. Lee (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* 130(6): 1071-1082.

Joller, N., R. Sporri, H. Hilbi und A. Oxenius (2007). "Induction and protective role of antibodies in *Legionella pneumophila* infection." *Eur J Immunol* 37(12): 3414-3423.

Joshi, A. D. und M. S. Swanson (2011). "Secrets of a successful pathogen: *legionella* resistance to progression along the autophagic pathway." *Front Microbiol* 2: 138.

Jun, S. H., J. H. Lee, B. R. Kim, S. I. Kim, T. I. Park, J. C. Lee und Y. C. Lee (2013). "*Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins." *PLoS One* 8(8): e71751.

Kadurugamuwa, J. L. und T. J. Beveridge (1995). "Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion." *J Bacteriol* 177(14): 3998-4008.

Kanonenberg, K., C. K. Schwarz und L. Schmitt (2013). "Type I secretion systems - a story of appendices." *Res Microbiol* 164(6): 596-604.

Kaparakis, M., L. Turnbull, L. Carneiro, S. Firth, H. A. Coleman, H. C. Parkinson, L. Le Bourhis, A. Karrar, J. Viala, J. Mak, M. L. Hutton, J. K. Davies, P. J. Crack, P. J. Hertzog, D. J. Philpott, S. E. Girardin, C. B. Whitchurch und R. L. Ferrero (2010). "Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells." *Cell Microbiol* 12(3): 372-385.

Karsan, A., E. Yee, K. Kaushansky und J. M. Harlan (1996). "Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells." *Blood* 87(8): 3089-3096.

Katsui, N., T. Tsuchido, R. Hiramatsu, S. Fujikawa, M. Takano und I. Shibasaki (1982). "Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 151(3): 1523-1531.

Kawai, T. und S. Akira (2007). "TLR signaling." *Semin Immunol* 19(1): 24-32.

Kawai, T. und S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.

Keenan, J., T. Day, S. Neal, B. Cook, G. Perez-Perez, R. Allardyce und P. Bagshaw (2000). "A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *FEMS Microbiol Lett* 182(2): 259-264.

Kesty, N. C. und M. J. Kuehn (2004). "Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles." *J Biol Chem* 279(3): 2069-2076.

Khan, A. A., D. Betel, M. L. Miller, C. Sander, C. S. Leslie und D. S. Marks (2009). "Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs." *Nat Biotechnol* 27(6): 549-555.

Kitchens, R. L. und R. S. Munford (1998). "CD14-dependent internalization of bacterial lipopolysaccharide (LPS) is strongly influenced by LPS aggregation but not by cellular responses to LPS." *J Immunol* 160(4): 1920-1928.

Kleinnijenhuis, J., J. Quintin, F. Preijers, L. A. Joosten, D. C. Ifrim, S. Saeed, C. Jacobs, J. van Loenhout, D. de Jong, H. G. Stunnenberg, R. J. Xavier, J. W. van der Meer, R. van Crevel und M. G. Netea (2012). "Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(43): 17537-17542.

Knox, K. W., M. Vesik und E. Work (1966). "Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 92(4): 1206-1217.

Kolling, G. L. und K. R. Matthews (1999). "Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol* 65(5): 1843-1848.

Kopanakis, K., I. M. Tzepe, A. Pistiki, D. P. Carrer, M. G. Netea, M. Georgitsi, M. Lymperi, D. I. Droggiti, T. Liakakos, A. Machairas und E. J. Giamarellos-Bourboulis (2013). "Pre-treatment with low-dose endotoxin prolongs survival from experimental lethal endotoxic shock: Benefit for lethal peritonitis by *Escherichia coli*." *Cytokine* 62(3): 382-388.

Kubori, T. und H. Nagai (2011). "Bacterial effector-involved temporal and spatial regulation by hijack of the host ubiquitin pathway." *Front Microbiol* 2: 145.

Kuehn, M. J. und N. C. Kesty (2005). "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction." *Genes Dev* 19(22): 2645-2655.

Lau, H. Y. und N. J. Ashbolt (2009). "The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water." *J Appl Microbiol* 107(2): 368-378.

Leo, J. C., I. Grin und D. Linke (2012). "Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1592): 1088-1101.

Li, S., Y. Yue, W. Xu und S. Xiong (2013). "MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6." *PLoS One* 8(12): e81438.

Liang, H., L. Huang, J. Cao, K. Zen, X. Chen und C. Y. Zhang (2012). "Regulation of mammalian gene expression by exogenous microRNAs." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(5): 733-742.

Lin, E. Y., A. Orlofsky, M. S. Berger und M. B. Prystowsky (1993). "Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2." *J Immunol* 151(4): 1979-1988.

Loeb, M. R. und J. Kilner (1978). "Release of a special fraction of the outer membrane from both growing and phage T4-infected *Escherichia coli* B." *Biochim Biophys Acta* 514(1): 117-127.

Losick, V. P., E. Haenssler, M. Y. Moy und R. R. Isberg (2010). "LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB." *Cell Microbiol* 12(8): 1083-1097.

Losick, V. P. und R. R. Isberg (2006). "NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*." *J Exp Med* 203(9): 2177-2189.

Ma, X., L. E. Becker Buscaglia, J. R. Barker und Y. Li (2011). "MicroRNAs in NF-kappaB signaling." *J Mol Cell Biol* 3(3): 159-166.

Maisonneuve, C., S. Bertholet, D. J. Philpott und E. De Gregorio (2014). "Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(34): 12294-12299.

Manning, A. J. und M. J. Kuehn (2011). "Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense." *BMC Microbiol* 11: 258.

Manning, A. J. und M. J. Kuehn (2013). "Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles." *J Mol Microbiol Biotechnol* 23(1-2): 131-141.

Mashburn-Warren, L. M. und M. Whiteley (2006). "Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes." *Mol Microbiol* 61(4): 839-846.

McBroom, A. J. und M. J. Kuehn (2007). "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response." *Mol Microbiol* 63(2): 545-558.

McCaig, W. D., A. Koller und D. G. Thanassi (2013). "Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*." *J Bacteriol* 195(6): 1120-1132.

McCall, C. E., M. El Gazzar, T. Liu, V. Vachharajani und B. Yoza (2011). "Epigenetics, bioenergetics, and microRNA coordinate gene-specific reprogramming during acute systemic inflammation." *J Leukoc Biol* 90(3): 439-446.

McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus und W. R. Dowdle (1977). "Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease." *N Engl J Med* 297(22): 1197-1203.

Medzhitov, R., D. S. Schneider und M. P. Soares (2012). "Disease tolerance as a defense strategy." *Science* 335(6071): 936-941.

Muder, R. R., V. L. Yu und A. H. Woo (1986). "Mode of transmission of *Legionella pneumophila*. A critical review." *Arch Intern Med* 146(8): 1607-1612.

Muller, A., J. Hacker und B. C. Brand (1996). "Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection." *Infect Immun* 64(12): 4900-4906.

Nahid, M. A., K. M. Pauley, M. Satoh und E. K. Chan (2009). "miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY." *J Biol Chem* 284(50): 34590-34599.

Newton, H. J., D. K. Ang, I. R. van Driel und E. L. Hartland (2010). "Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*." *Clin Microbiol Rev* 23(2): 274-298.

Nivaskumar, M. und O. Francetic (2014). "Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator." *Biochim Biophys Acta* 1843(8): 1568-1577.

O'Ryan, M., J. Stoddard, D. Toneatto, J. Wassil und P. M. Dull (2014). "A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program." *Drugs* 74(1): 15-30.

Orlofsky, A., M. S. Berger und M. B. Prystowsky (1991). "Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes." *Cell Regul* 2(5): 403-412.

Oster, P., D. Lennon, J. O'Hallahan, K. Mulholland, S. Reid und D. Martin (2005). "MenZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain." *Vaccine* 23(17-18): 2191-2196.

Palusinska-Szys, M. und M. Janczarek (2010). "Innate immunity to *Legionella* and toll-like receptors - review." *Folia Microbiol (Praha)* 55(5): 508-514.

Pettit, R. K. und R. C. Judd (1992). "The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum." *Mol Microbiol* 6(6): 729-734.

Pollak, C. N., M. V. Delpino, C. A. Fossati und P. C. Baldi (2012). "Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response." *PLoS One* 7(11): e50214.

Prados-Rosales, R., A. Baena, L. R. Martinez, J. Luque-Garcia, R. Kalscheuer, U. Veeraraghavan, C. Camara, J. D. Nosanchuk, G. S. Besra, B. Chen, J. Jimenez, A. Glatman-Freedman, W. R. Jacobs, Jr., S. A. Porcelli und A. Casadevall (2011). "Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice." *J Clin Invest* 121(4): 1471-1483.

Price, C. T., A. M. Richards, J. E. Von Dwingelo, H. A. Samara und Y. Abu Kwaik (2014). "Amoeba host-*Legionella* synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution." *Environ Microbiol* 16(2): 350-358.

Quintin, J., S. Saeed, J. H. Martens, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. C. Ifrim, C. Logie, L. Jacobs, T. Jansen, B. J. Kullberg, C. Wijmenga, L. A. Joosten, R. J. Xavier, J. W. van der Meer, H. G. Stunnenberg und M. G. Netea (2012). "Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes." *Cell Host Microbe* 12(2): 223-232.

Robert-Koch-Institut (2013) Epidemiologisches Bulletin - Legionellose.

Robert-Koch-Institut (2014).
["http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM_Tab_Legionella_pneumophila.html"](http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM_Tab_Legionella_pneumophila.html)

Saba, R., D. L. Sorensen und S. A. Booth (2014). "MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response." *Front Immunol* 5: 578.

Sahoo, M., L. Del Barrio, M. A. Miller und F. Re (2014). "Neutrophil elastase causes tissue damage that decreases host tolerance to lung infection with burkholderia species." *PLoS Pathog* 10(8): e1004327.

Santic, M., M. Molmeret und Y. Abu Kwaik (2005). "Maturation of the *Legionella pneumophila*-containing phagosome into a phagolysosome within gamma interferon-activated macrophages." *Infect Immun* 73(5): 3166-3171.

Saunders, N. B., D. R. Shoemaker, B. L. Brandt, E. E. Moran, T. Larsen und W. D. Zollinger (1999). "Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice." *Infect Immun* 67(1): 113-119.

Schmeck, B., P. D. N'Guessan, M. Ollomang, J. Lorenz, J. Zahlten, B. Opitz, A. Flieger, N. Suttrop und S. Hippenstiel (2007). "Legionella pneumophila-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells." *Eur Respir J* 29(1): 25-33.

Schooling, S. R. und T. J. Beveridge (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." *J Bacteriol* 188(16): 5945-5957.

Shevchuk, O., J. Jager und M. Steinert (2011). "Virulence properties of the legionella pneumophila cell envelope." *Front Microbiol* 2: 74.

Shim, H. K., J. Y. Kim, M. J. Kim, H. S. Sim, D. W. Park und J. W. Sohn (2009). "Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages." *Exp Mol Med* 41(10): 687-694.

Shin, S. (2012). "Innate Immunity to Intracellular Pathogens: Lessons Learned from Legionella pneumophila." *Adv Appl Microbiol* 79: 43-71.

Sjostrom, A. E., L. Sandblad, B. E. Uhlin und S. N. Wai (2015). "Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA." *Sci Rep* 5: 15329.

Stephens, D. S., K. M. Edwards, F. Morris und Z. A. McGee (1982). "Pili and outer membrane appendages on Neisseria meningitidis in the cerebrospinal fluid of an infant." *J Infect Dis* 146(4): 568.

Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang und D. Baltimore (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12481-12486.

Taylor, M., K. Ross und R. Bentham (2009). "Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems." *Microb Ecol* 58(3): 538-547.

Thery, C., S. Amigorena, G. Raposo und A. Clayton (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3: Unit 3 22.

Tyson, J. Y., M. M. Pearce, P. Vargas, S. Bagchi, B. J. Mulhern und N. P. Cianciotto (2013). "Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*." *Infect Immun* 81(5): 1399-1410.

van de Waterbeemd, B., G. Zomer, J. van den Ijssel, L. van Keulen, M. H. Eppink, P. van der Ley und L. A. van der Pol (2013). "Cysteine depletion causes oxidative stress and triggers outer membrane vesicle release by *Neisseria meningitidis*; implications for vaccine development." *PLoS One* 8(1): e54314.

Vincent, C. D., J. R. Friedman, K. C. Jeong, E. C. Buford, J. L. Miller und J. P. Vogel (2006). "Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system." *Mol Microbiol* 62(5): 1278-1291.

Ward, H. E. und T. E. Nicholas (1984). "Alveolar type I and type II cells." *Aust N Z J Med* 14(5 Suppl 3): 731-734.

Welsh, C. T., J. T. Summersgill und R. D. Miller (2004). "Increases in c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase and p38 activity in monocyte-derived macrophages following the uptake of *Legionella pneumophila*." *Infect Immun* 72(3): 1512-1518.

Whitmire, W. M. und C. F. Garon (1993). "Specific and nonspecific responses of murine B cells to membrane blebs of *Borrelia burgdorferi*." *Infect Immun* 61(4): 1460-1467.

Zong, W. X., L. C. Edelstein, C. Chen, J. Bash und C. Gelinas (1999). "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis." *Genes Dev* 13(4): 382-387.

5 Anhang

5.1 *Legionella pneumophila*-derived outer membrane vesicles promote bacterial replication in macrophages



RESEARCH ARTICLE

Legionella pneumophila-Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages

Anna Lena Jung¹, Cornelia Stoiber², Christina E. Herkt¹, Christine Schulz¹, Wilhelm Bertrams¹, Bernd Schmeck^{1,3*}

1 Institute for Lung Research, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Philipps-University Marburg, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Marburg, Germany, **2** Institute for Virology, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany, **3** Department of Medicine, Pulmonary and Critical Care Medicine, University Medical Center Giessen and Marburg, Philipps-University, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Marburg, Germany

* bernd.schmeck@uni-marburg.de



OPEN ACCESS

Citation: Jung AL, Stoiber C, Herkt CE, Schulz C, Bertrams W, Schmeck B (2016) *Legionella pneumophila*-Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages. PLoS Pathog 12(4): e1005592. doi:10.1371/journal.ppat.1005592

Editor: Zhao-Qing Luo, Purdue University, UNITED STATES

Received: November 26, 2015

Accepted: April 1, 2016

Published: April 22, 2016

Copyright: © 2016 Jung et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Part of this work has been funded by Bundesministerium für Bildung und Forschung (e:bio miRSys - FKZ 0316175B, e:Med CAPSYS - FKZ 01X1304E; <http://www.bmbf.de/>) to BS, and Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TR-84; <http://www.sfb-tr84.de/>) and Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst (LOEWE Medical RNomics - FKZ 519/03/00.001-(0003); <http://www.proloewe.de/medicalomics>) to BS. The funders had no role in

Abstract

The formation and release of outer membrane vesicles (OMVs) is a phenomenon of Gram-negative bacteria. This includes *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), a causative agent of severe pneumonia. Upon its transmission into the lung, *L. pneumophila* primarily infects and replicates within macrophages. Here, we analyzed the influence of *L. pneumophila* OMVs on macrophages. To this end, differentiated THP-1 cells were incubated with increasing doses of *Legionella* OMVs, leading to a TLR2-dependent classical activation of macrophages with the release of pro-inflammatory cytokines. Inhibition of TLR2 and NF- κ B signaling reduced the induction of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, treatment of THP-1 cells with OMVs prior to infection reduced replication of *L. pneumophila* in THP-1 cells. Blocking of TLR2 activation or heat denaturation of OMVs restored bacterial replication in the first 24 h of infection. With prolonged infection-time, OMV pre-treated macrophages became more permissive for bacterial replication than untreated cells and showed increased numbers of *Legionella*-containing vacuoles and reduced pro-inflammatory cytokine induction. Additionally, miRNA-146a was found to be transcriptionally induced by OMVs and to facilitate bacterial replication. Accordingly, IRAK-1, one of miRNA-146a's targets, showed prolonged activation-dependent degradation, which rendered THP-1 cells more permissive for *Legionella* replication. In conclusion, *L. pneumophila* OMVs are initially potent pro-inflammatory stimulators of macrophages, acting via TLR2, IRAK-1, and NF- κ B, while at later time points, OMVs facilitate *L. pneumophila* replication by miR-146a-dependent IRAK-1 suppression. OMVs might thereby promote spreading of *L. pneumophila* in the host.

Author Summary

Of all intracellular pathogens, *Legionella pneumophila* show the highest genetic adaptation to the host. They are important human pathogens causing mainly pneumonia, but are also

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

highly successful pathogens of water amoeba. To manipulate host cells for optimal intracellular replication, they express several hundred specific virulence factors, which they apply to their host cells by two different secretion systems. Another intriguing avenue that leads to the transfer of virulence factors to host cells—even over distance—is the transport via outer membrane vesicles (OMV) that are released by *Legionella*. We report here that after exposure to these vesicles, macrophages become permissive hosts for bacterial replication incapable of efficient pathogen defense. In addition, markers of inflammation that are induced by OMV pre-treatment do not further increase upon subsequent bacterial infection. This goes along with improved survival of infected macrophages despite the increased intracellular bacterial growth. We could attribute this effect to TLR- and NF- κ B-dependent mechanisms of microRNA-146a induction and prolonged IRAK-1 depletion.

Introduction

Bacteria have developed numerous strategies to deliver virulence factors into their eukaryotic host cells. In close proximity, the transfer of virulence factors can take place by direct translocation into the host cytosol. Distant cells can be reached by the secretion of soluble proteases, lipases or toxins to the extracellular environment [1]. Additionally, Gram-negative bacteria developed the strategy of outer membrane vesicle (OMV) formation. OMVs are small, spheroid membrane vesicles of 10–300 nm in diameter, secreted during all phases of growth as well as in a variety of growth environments (liquid culture, solid culture, biofilms) [2, 3]. They transport diverse virulence factors, including proteins, adhesins, toxins and enzymes as well as non-protein antigens such as lipopolysaccharide (LPS), which is present on the outer leaflet of the OMV membrane [4]. They serve as a means of communication among bacteria, but can also be recognized and taken up by eukaryotic cells [4]. OMVs may influence the course of infection and the host immune response by presenting pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and antigens to their respective host receptors [5]. For example OMVs derived from *Clostridium perfringens* induce cytokine secretion in macrophages, *Borrelia burgdorferi* OMVs activate B cells, and vesicles secreted by *Helicobacter pylori* act on gastric epithelial cells [6–8]. In addition, OMVs transport active virulence factors of Gram-negative bacteria which gain access to the extracellular environment and can act over long distances, since the vesicular membrane protects the luminal cargo from extracellular host proteases and facilitates penetration into tissue [9–11]. OMVs have been found not only in close proximity to the site of bacterial colonization, but also in body fluids and distant organs [12]. Furthermore, they can mediate bacterial binding and invasion into host cells and cause cytotoxicity [4].

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) is a Gram-negative bacterium that replicates in freshwater amoebae [13]. When it enters the human lung, it primarily infects alveolar macrophages and can cause legionnaires' disease, an acute fibrinopurulent pneumonia [14]. Macrophages have been described to respond to *L. pneumophila* infection by up-regulation of TNF- α , IL-6 and IL-1 β [15]. These factors potentially contribute to the establishment of a pro-inflammatory activation state, which is commonly referred to as classical macrophage activation (M1). In contrast, alternatively activated macrophages (M2), as characterized *e.g.* by CD206 (MRC1), do not show increased bactericidal potential. Upon infection, macrophages establish a transient activation state in the spectrum between these two canonical states, and this balance is decisive for the disposal of intracellular bacteria. *L. pneumophila* manipulates the host by secreting effector proteins into the cytoplasm via its type IV secretion system, leading to the blockage of phagosome-lysosome fusion, thus enabling *L. pneumophila* to recruit host

organelles and to form its replication niche, the *Legionella* containing vacuole (LCV) [16, 17]. The inhibition of phagosome-lysosome fusion is achieved by effector protein secretion, and also by secretion of OMVs [18]. A proteomic analysis of *L. pneumophila* OMVs revealed about 70 proteins, many of them exclusively secreted via OMVs and associated with virulence function, e.g. persistence and spreading in the lung (fliC [19]), invasion (IcmK [20]) or intracellular survival and replication (ProA1 [21]). Additionally, *L. pneumophila* OMVs display proteolytic and lipolytic activity *in vitro* [22]. Experiments with human lung tissue explants (HLTE) demonstrated that OMVs can cause tissue damage [23]. Immune histological analysis of OMV-treated HLTE showed that OMVs were mainly bound to alveolar macrophages [24]. Since it is known that *L. pneumophila* OMVs are pro-inflammatory activators of macrophages and epithelial cells [22, 23], we aimed to analyze the impact of *L. pneumophila* OMVs on macrophage activation and their influence on a subsequent infection with *L. pneumophila*. As the innate immune response largely depends on the recognition of PAMPs, e.g. LPS, in their natural context, we speculate that *L. pneumophila* OMVs could have immunomodulatory functions, as already described for *Brucella abortus* OMVs [25] and OMVs derived from *Porphyromonas gingivalis* [26]. We investigated for the first time the influence of *L. pneumophila* OMV pretreatment on a subsequent infection with *L. pneumophila* and the role of PAMP receptors and associated signaling pathways in OMV sensing.

Results

Pro-inflammatory activation of macrophages by *L. pneumophila* OMVs

As macrophages are the main target of *L. pneumophila* infection and replication [14], we tested the effect of *L. pneumophila* OMVs on macrophages. We incubated PMA-differentiated macrophage-like THP-1 cells with increasing doses of OMVs (0.01–25 µg/mL according to the protein concentration) for 24 and 48 h, respectively. The lowest OMV dose (0.01 µg/mL) was sufficient to induce a significant pro-inflammatory IL-8 release in THP-1 cells (Fig 1A) that increased time- and dose-dependently. Moreover, we observed a time- and dose-dependent release of IL-6 (Fig 1B) and IL-10 (Fig 1E) and a dose-dependent release of TNF-α (Fig 1C) and IL-1β (Fig 1D).

To gain further insight into the OMV amounts present under infection conditions, we generated bacteria-free cell culture supernatant of infected THP-1 cells (MOI 0.5, 24 h) by sterile filtration. The remaining membrane bodies were pelleted by differential centrifugation and probed for their LPS content. We detected LPS amounts which equal 0.04–0.08 µg of free OMVs. Given the fact that *L. pneumophila* OMVs are rapidly internalized by macrophages [24] and that we could only measure free OMVs after the incubation time, 0.1, 1, and 10 µg/mL OMVs were used for the following experiments.

No decrease in cell viability was observed by MTT assay for up to 96 h of OMV incubation (S1 Fig) in accordance to previous studies [22, 24].

Since macrophages sense *L. pneumophila* via LPS on the bacterial surface mainly by TLR2 [27, 28], we hypothesized that OMVs might stimulate macrophages in a similar way. We used murine bone marrow-derived macrophages (mBMDM) from wildtype and TLR2/4^{-/-} mice, which were treated with 0.1 or 1 µg/mL OMVs for 24 and 48 h, respectively. CXCL1, the murine functional homologue of IL-8, served as a measure for pro-inflammatory activation of mBMDM. Wildtype mBMDM secreted significant amounts of CXCL1 dose-dependently when incubated with OMVs (Fig 1F). Contrary to wildtype cells, TLR2/4^{-/-} cells showed a rigorously reduced response to OMVs, as CXCL1 secretion was only slightly above the detection limit (0.2 ng/mL for both OMV concentrations). These results demonstrate that *L. pneumophila* OMVs are pro-inflammatory stimulators of macrophages and that macrophage activation occurs in a TLR2-dependent manner.

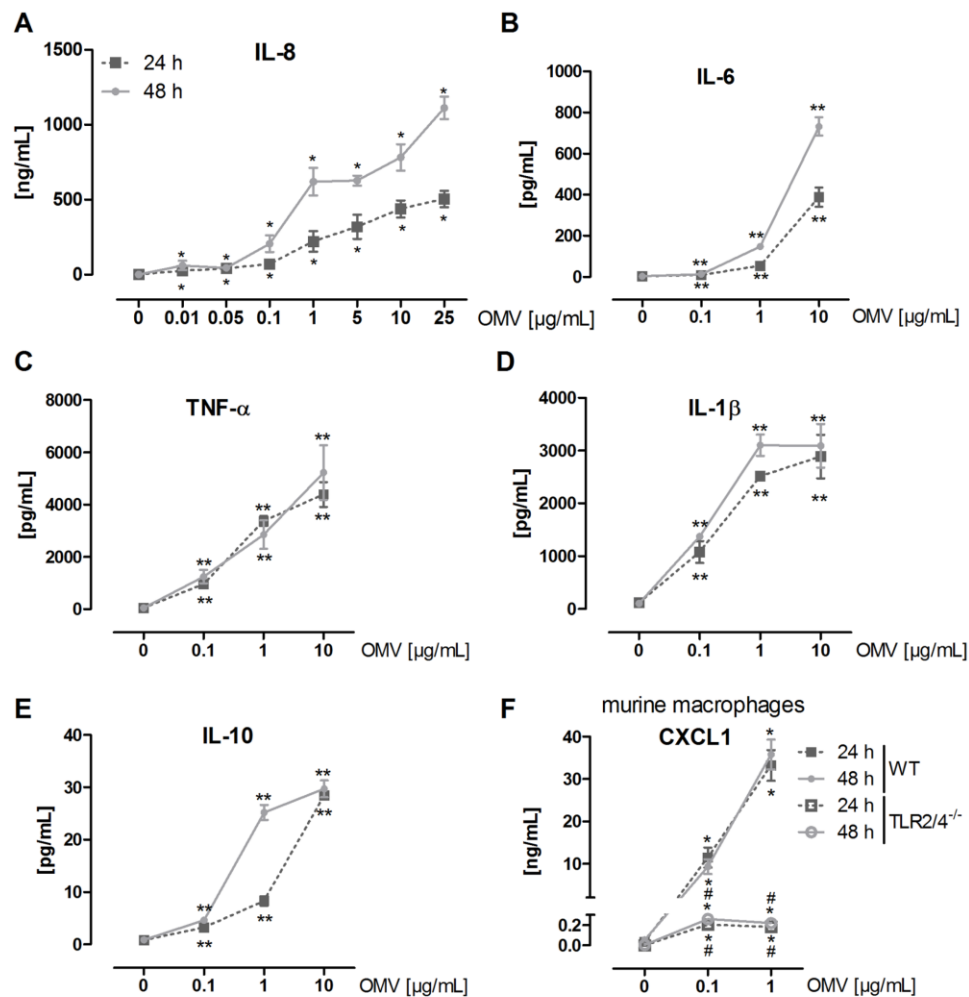


Fig 1. *L. pneumophila* OMVs induce cytokine secretion in macrophages. (A) THP-1 cells were incubated with rising amounts of OMVs (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 25 μg/mL) for 24 or 48 h, respectively, or left untreated for control. Supernatant was collected for IL-8 ELISA. (B-E) THP-1 cells were incubated with rising amounts of OMVs (0.1, 1, 10 μg/mL) for 24 or 48 h, respectively, or left untreated for control. Supernatant was collected for magnetic multiplex ELISA. Results for IL-6 (B), TNF-α (C), IL-1β (D), and IL-10 (E) are shown. (F) mBMDM (wildtype (WT) and TLR2/4^{-/-}) were stimulated with OMVs (0.1, 1 μg/mL) for 24 or 48 h, respectively, or left untreated for control. Supernatant was collected for CXCL1 ELISA. Mean values of three independent experiments are shown. Statistics: Mann-Whitney test; *p<0.05 and **p<0.01 compared to corresponding control. #p<0.05 compared to equally treated WT sample.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g001

L. pneumophila OMVs alter bacterial replication in macrophages

We investigated whether cellular contact with *L. pneumophila* OMVs has an impact on a following encounter with *L. pneumophila*. To this end, cells were pre-incubated with OMVs for 20 h, as they already responded with a pro-inflammatory response at this time point, and then infected with *L. pneumophila*. Cells were lysed at different time points to monitor bacterial

uptake (2 h post infection (p.i.)) and replication (24 and 48 h p.i.) by CFU (colony forming unit) count. Infected cells without OMV pre-treatment served as a reference, and *L. pneumophila* replication in not pre-treated THP-1 cells is shown in [S2A Fig](#). LPS/IFN- γ stimulation of THP-1 cells was used to induce a classical (M1) phenotype, which enables macrophages to efficiently kill *L. pneumophila* [29]. Lysis of cells 2 h p.i. did not reveal differences in bacterial uptake capacity in any of the tested conditions ([Fig 2A](#) and [S2B Fig](#)). Bacterial replication was significantly reduced at 24 h p.i. by 42% after LPS/IFN- γ pre-treatment. OMV pre-incubation showed similar tendencies; 0.1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs only modestly reduced *L. pneumophila* replication (10% reduction), whereas 1 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$ of OMVs significantly reduced the bacterial load 24 h p.i. (23% and 33% reduction). At 48 h p.i., LPS/IFN- γ treated cells had progressively killed *L. pneumophila* (96% reduction). In contrast to LPS/IFN- γ , OMV pre-treatment had an enhancing effect on bacterial load (0.1 $\mu\text{g/mL}$: 88%, 1 $\mu\text{g/mL}$: 119%, 10 $\mu\text{g/mL}$: 118% more as compared to control). Additionally, we tested whether this mechanism also holds true with an *L. pneumophila* mutant which is not able to establish its replication vacuole in macrophages as it lacks a functional dot/icm system [17, 30]. To this extent, THP-1 cells were pre-stimulated with OMVs from WT *L. pneumophila* and infected with *L. pneumophila* ΔdotA mutant. Bacterial replication was analyzed by CFU assay. Interestingly, the highest dose of OMVs could enhance the replication of *L. pneumophila* ΔdotA by a factor of more than 14 at 48 h p.i. ([S2C Fig](#)).

Overall, pre-incubation of macrophages with OMVs leads to an altered bacterial replication.

OMVs enhance the intracellular vacuole amount in a subsequent infection with *L. pneumophila*

As we detected a doubling in *L. pneumophila* replication after OMV pre-treatment, we aimed to gain insight into the fate of intracellular *L. pneumophila*. Immunofluorescence microscopy analysis was performed with not pre-treated and OMV pre-treated THP-1 cells which were subsequently infected with *L. pneumophila* for 48 h. After exposure of THP-1 cells to OMVs, an increased maximal cell diameter was observed (33.2 μm vs 19.1 μm). Not pre-treated THP-1 cells had one or two vacuoles per cell ([Fig 2B](#) and [2C](#)), while in THP-1 cells with OMV pre-treatment, several LPS positive vacuoles were detected within the cytoplasm. Eighty percent of the not pre-treated cells had one or two vacuoles per cell. In contrast, only 56% of OMV pre-treated cells had one or two vacuoles ([Fig 2D](#)).

Contact with OMVs before an infection with *L. pneumophila* seems to increase the vacuole amount per cell in macrophages.

OMVs render macrophages less responsive to an infection with *L. pneumophila*

We further examined the expression of established markers of classically activated macrophages (M1; IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and alternatively activated macrophages (M2; CD206) [31, 32]. After infection of not pre-treated THP-1 cells, an increase in IL-1 β expression was observed ([Fig 3A](#)). In contrast, while both pre-treatments (OMVs or LPS/IFN- γ) increased basal levels of IL-1 β mRNA, they inhibited a further transcriptional induction above the initially induced level. Only the lowest dose of OMVs (0.1 $\mu\text{g/mL}$) that triggered a weak induction of IL-1 β transcript allowed a minor additional increase after 48 h of infection. Similar results were obtained for TNF- α ([Fig 3B](#)) and IL-6 ([Fig 3C](#)). CD206, a marker for alternatively activated macrophages, was down-regulated after *L. pneumophila* infection of not pre-treated cells ([Fig 3D](#)). OMV pre-treatment resulted in a significantly reduced expression of CD206, which was comparable to infected and not pre-treated cells at 48 h p.i.. These experiments

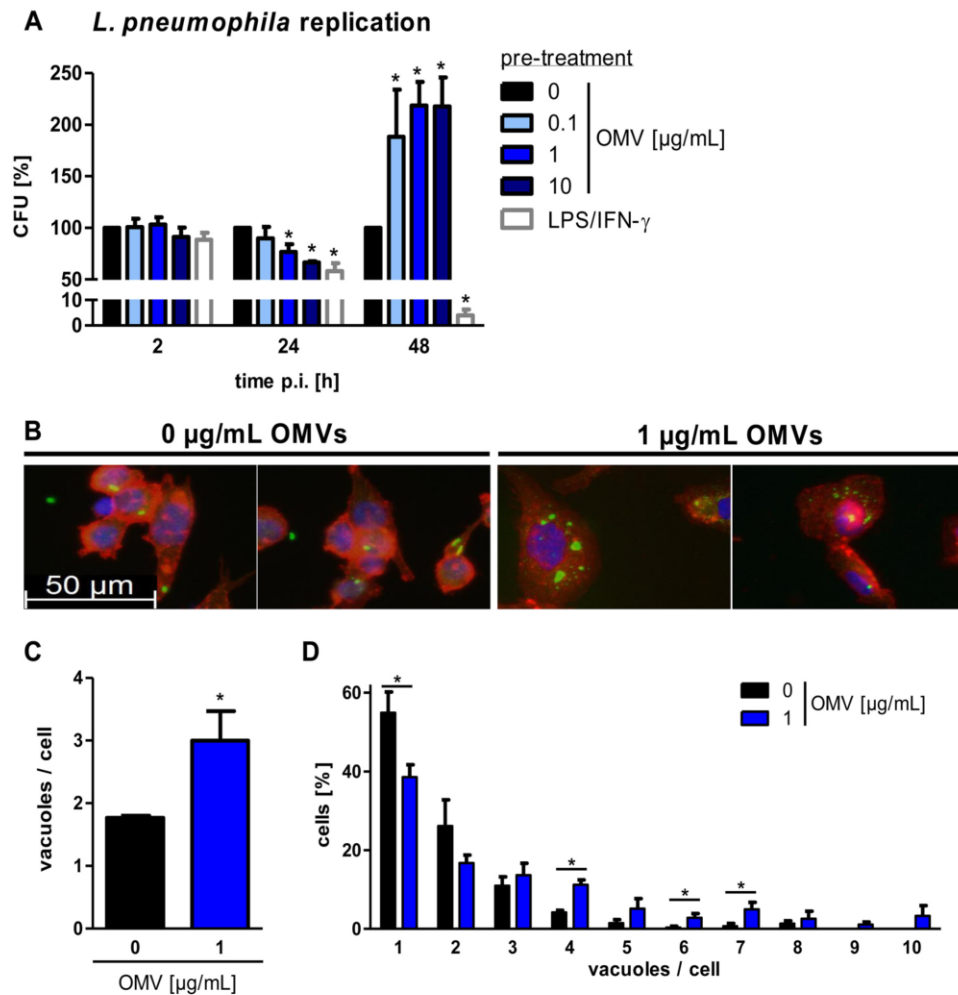


Fig 2. *L. pneumophila* OMVs alter bacterial replication and increase the vacuole amount per cell. (A) THP-1 cells were pre-incubated for 20 h with different doses of OMVs (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$) and were then infected with *L. pneumophila* (multiplicity of infection (MOI) of 0.5). Pre-stimulation with LPS (200 ng/mL) in combination with IFN- γ (200 ng/mL) served as a positive control for classically activated macrophages (M1). Bacterial replication after OMV pre-stimulation was determined by CFU assay. Cells were lysed after the indicated time points. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells at every time point. (B) THP-1 cells were pre-treated with OMVs (1 $\mu\text{g/mL}$) for 20 h or left untreated before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5) for 48 h. Cells were fixed and stained with an α -LPS antibody (green), phalloidin (red), and DAPI (blue). One representative out of three independent experiments is shown. (C) Quantification of the number of vacuoles per cells of more than 70 cells per condition. Data are shown as mean values of three independent experiments. (D) Quantification of the distribution of vacuoles per cells. Mean values of three independent experiments are shown. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g002

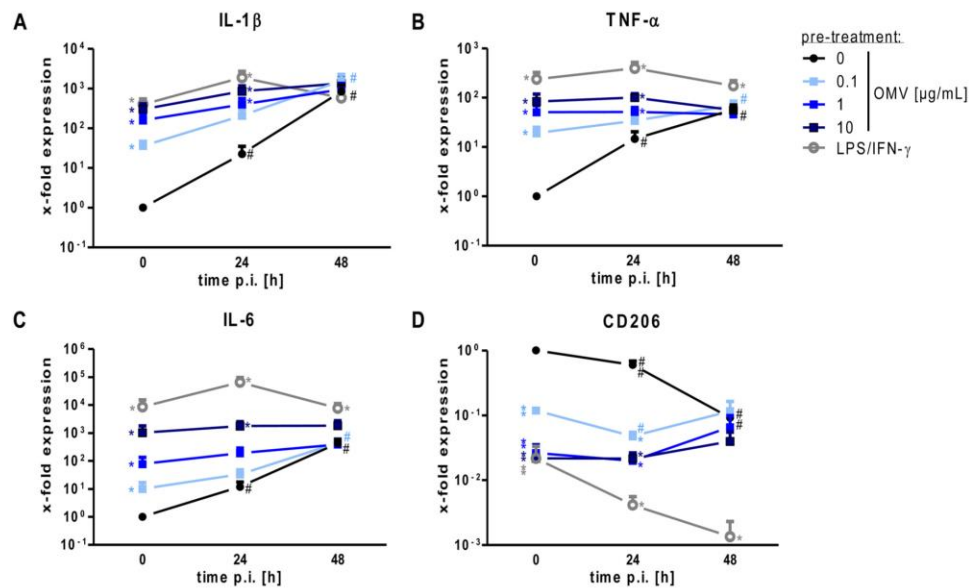


Fig 3. OMVs reduce responsiveness of macrophages to *L. pneumophila* infection. (A-D) THP-1 cells treated as described in Fig 2A and RNA samples were taken at the time of infection (0 h) or 24 and 48 h post infection (p.i.). qPCR was performed for markers of classically activated macrophages (A: IL-1 β , B: TNF- α , C: IL-6) and alternatively activated macrophages (D: CD206). Results are normalized to untreated control cells at every time point. Mean values of three independent experiments are shown. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. # $p < 0.05$ compared to equally treated 0 h sample.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g003

demonstrate a reduced M1 response of macrophages to an infection with *L. pneumophila* when pre-incubated with OMVs in comparison to naïve macrophages.

LPS is important for the response of macrophages to OMVs

We then aimed to identify the OMV component mediating the observed differences in bacterial replication and M1 activation. OMVs were incubated for 5 min at 60°C, denaturing proteins but preserving OMV shape and membrane integrity [33]. Cells were pre-treated with heated OMVs and infected with *L. pneumophila*, and bacterial replication was determined by CFU assay. Here, the effect of 1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs was compared to 1 $\mu\text{g/mL}$ heated OMVs. Interestingly, the heated OMVs did not significantly alter the bacterial replication at 24 h p.i. in comparison to not pre-treated cells (8% reduction; S3A Fig). At 48 h p.i., cells pre-treated with heat-denaturated OMVs were equally permissive to *L. pneumophila* replication as cells pre-treated with non-heated OMVs.

OMVs display LPS on their surface, which is a potent activator of macrophages. The LPS concentration of the OMV preparations was determined by Limulus amoebocyte lysate test. OMVs contained 0.22 μg LPS per 1 μg protein. *L. pneumophila* has a unique LPS structure, which is sensed via TLR2 on the cell surface [27, 34]. Thus, a lipoteichoic acid and lipoprotein containing cell wall preparation (LTA), activating TLR2, or a *Salmonella minnesota* LPS preparation, activating TLR4, were used for alternative pre-treatment of THP-1 cells to test whether TLR activation alone is able to alter the response of macrophages to an infection with *L. pneumophila*. The bacterial load was significantly reduced by TLR2 or TLR4 activation before the

infection (24 h p.i.: 19% or 12% reduction; 48 h p.i.: 39% or 60% reduction; [S3B Fig](#)). Furthermore, a TLR2 blocking antibody was used alone or in combination with OMVs to analyze the influence of TLR2 signaling—presumably activated by LPS—in the response of macrophages to *L. pneumophila* OMVs. Blockage of TLR2 signaling before infection did not significantly alter *L. pneumophila* replication, as determined by CFU assay. The combination of OMVs with the blocking antibody led to significantly more bacteria at 24 h p.i. (22% increase), but did not alter the bacterial load at 48 h p.i.. Incubation with a control antibody in combination with OMVs did not reveal significant differences.

To validate blocking efficiency of the TLR2 antibody we analyzed expression of macrophage activation markers. The combination of OMVs with the TLR2 blocking antibody led to a reduced mRNA induction of the M1 markers IL-1 β ([S3C Fig](#)), TNA- α ([S3D Fig](#)) and IL-6 ([S3E Fig](#)), whereas the expression of the M2 marker CD206 was increased ([S3F Fig](#)).

Furthermore, *L. pneumophila* replication after OMV pre-incubation was analyzed in mBMDM from different genetic backgrounds. In WT mBMDM, OMV pre-treatment before infection induced the bacterial replication by a factor of 15 ([S3G Fig](#)). In mBMDM lacking TLR2 receptor bacterial replication was significantly reduced in comparison to WT cells. Additionally, we used TRIF/MyD88 double knockouts to block any TLR signaling in CFU assays. TRIF/MyD88^{-/-} cells showed a response to OMV pre-treatment similar to TLR2^{-/-} cells, as the replication was 7.5 fold reduced compared to WT mBMDM.

Taken together, inhibition of TLR2 activation blocked the initial bacterial killing in the macrophages, and bacterial replication was reduced at later time points. Therefore, TLR2 activation seems to be of equal importance for the initial stimulation of macrophages and the bacterial replication.

OMV membrane integrity is essential for the macrophage response

Since it has been shown for *L. pneumophila* OMVs that they may contain fliC [22], which is able to induce pro-inflammatory cell activation via TLR5 [35], we tested whether flagellin was inducing the observed effect. For this, cells were pre-exposed to OMVs obtained from Δ fliA *L. pneumophila* which were generated as the wildtype OMVs, but no differences could be observed in comparison to OMVs from wildtype *L. pneumophila* in the ability to render THP-1 cells more permissive for bacterial replication ([S4A Fig](#)).

As OMVs do not only contain LPS and proteins but also nucleic acids [36, 37], we assessed their influence on *L. pneumophila* replication in macrophages in more detail. OMVs were treated with RNases (RNase A and RNase III) or DNase in the presence or absence of Triton X-100. In the following CFU assay, disruption of OMV membrane prevented the increase in bacterial replication in THP-1 macrophages ([S4B Fig](#)). At 24 h p.i., Triton X-100 treatment of OMVs did not change bacterial replication in comparison to untreated control cells. This correlation was still observed upon 48 h p.i. while untreated OMVs increased the replication 4 fold. The exposure of OMVs to RNases or DNase alone did not alter *L. pneumophila* replication. Addition of Triton X-100 to RNases/DNases reduced *L. pneumophila* replication comparable to Triton X-100 alone.

Therefore we conclude that OMVs membrane integrity is essential for the response of macrophages to a following infection with *L. pneumophila*.

NF- κ B is involved in the macrophage response to OMVs from *L. pneumophila*

A key molecule downstream of TLR signaling is the transcription factor NF- κ B [38]. As NF- κ B activation is rapidly seen after *L. pneumophila* infection [39], we asked whether NF- κ B is

equally important in the OMV context. Cell fractionation experiments were performed after short time OMV incubation (30 min) and we could demonstrate that NF- κ B subunit p65 is rapidly shuttling into the nucleus after OMV stimulation of THP-1 cells (S5 Fig).

We then inhibited the IKK complex with a small molecule inhibitor, which was used alone or in combination with OMV pre-treatment before THP-1 cells were infected with *L. pneumophila*, after testing that the IKK inhibitor does not reduce the cell viability (S6 Fig). CFU count revealed that NF- κ B inhibition did not affect the early phase of *L. pneumophila* replication. Interestingly, it influenced the long-term replication, as observed by a reduction in bacterial replication by 68% at 48 h p.i. (Fig 4A). Combination of OMVs with the IKK inhibitor reduced the bacterial load to 50% at 48 h p.i., compared to DMSO control. To test whether NF- κ B inhibition also affected the expression of M1/M2 markers, qPCR analysis was performed. For all analyzed M1 markers, the expression was reduced at the 0 h time point, i.e. by OMV pre-treatment (Fig 4B–4D). This reduction was not maintained throughout the course of infection in any of the observed cases. CD206, an M2 marker, showed an increased expression when NF- κ B was inhibited (Fig 4E).

This implies that the canonical NF- κ B pathway is necessary for early M1 activation of macrophages and intracellular long-term replication of *L. pneumophila*.

OMV treatment increases cell viability of *L. pneumophila* infected macrophages

Since we observed a strong dependence on NF- κ B signaling in the response of macrophages to *L. pneumophila* OMVs and since NF- κ B has also anti-apoptotic targets [40], we analyzed the influence of OMVs on THP-1 cell viability in the course of infection with *L. pneumophila*. The amount of viable cells decreased during infection in not pre-treated cells (24 h p.i.: 16% reduction; 48 h p.i.: 45% reduction in comparison to untreated control cells) as a replication cycle of *L. pneumophila* in eukaryotic cells ends with the induction of host cell apoptosis concomitant with bacterial egress [41] (S7A Fig). However, in OMV pre-treated cells, the amount of viable cells was doubled at the lowest dose of OMVs and tripled at the highest dose at 48 h p.i.. We conclude that *L. pneumophila* OMVs improve cell viability throughout a following infection with *L. pneumophila*.

We investigated the expression of BCL2A1, an anti-apoptotic NF- κ B target gene that has been demonstrated to be expressed in *L. pneumophila* infection [42]. We observed increased expression of BCL2A1 in OMV pre-treated cells compared to unstimulated cells (S7B Fig). At 24 h p.i., cells treated with higher doses of OMVs still had significantly more BCL2A1 compared to not pre-treated cells. The gain of OMV-treated cells over untreated cells was lost at 48 h p.i., when both pre-treated and not pre-treated cells had a high BCL2A1 expression.

Next we examined whether the activated anti-apoptotic signaling is responsible for the increase in bacterial replication after OMV pre-stimulation of macrophages. To this end, THP-1 cells were pre-treated with the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk and then infected with *L. pneumophila*. The CFU assay did not reveal significant differences in bacterial replication after caspase inhibition (S7C Fig).

The expression of BCL2A1 together with a higher level of cell viability suggests that OMV exposure activates anti-apoptotic signaling via NF- κ B in macrophages.

L. pneumophila OMVs lead to miR-146a induction

The strong dependence on intact NF- κ B signaling for *L. pneumophila* replication and the involvement of TLR2 in OMV recognition led us to test for expression of the anti-inflammatory microRNA 146a (miR-146a), as it has been shown to be involved in the response to

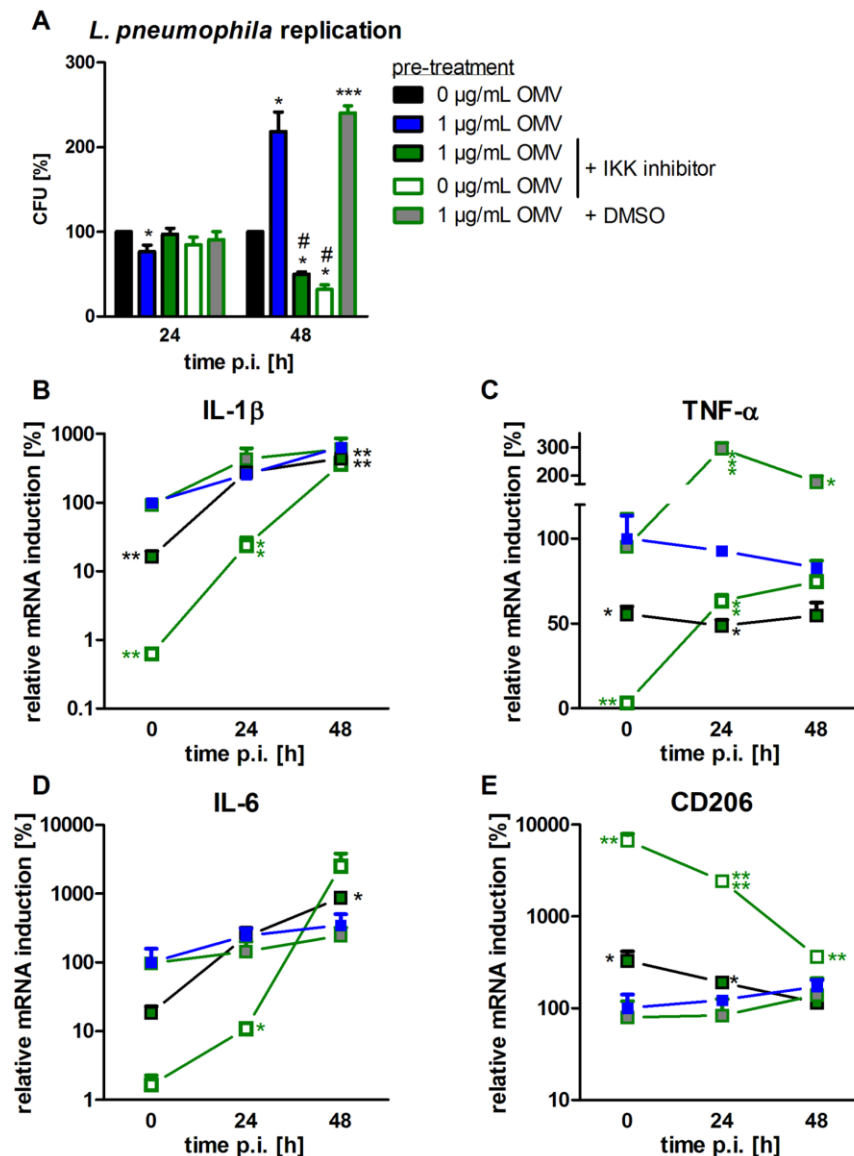


Fig 4. Blocking of NF- κ B signaling prior to OMV treatment reduces bacterial replication and M1 activation. THP-1 cells were pre-incubated with IKK inhibitor (1 μ M) 90 min before OMV stimulation (1 μ g/mL). DMSO was used as a solvent control. After 20 h of OMV incubation, cells were infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and lysed for CFU 24 and 48 h p.i.. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells (A). RNA samples were taken at the time point of infection (0 h) or 24 and 48 h p.i.. qPCR was performed for IL-1 β (B), TNF- α (C), IL-6 (D), and CD206 (E). Results are calculated relative to the time point of infection (0 h) with 1 μ g/mL OMV treatment. Mean values of three independent experiments are shown. Symbol key is used for all parts of the figure. **Statistics:** A: Mann-Whitney test; * p <0.05 compared to 0 μ g/mL OMVs. # p <0.05 compared to 1 μ g/mL OMVs. B-E: Mann-Whitney test; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 compared to 1 μ g/mL OMV treatment.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g004

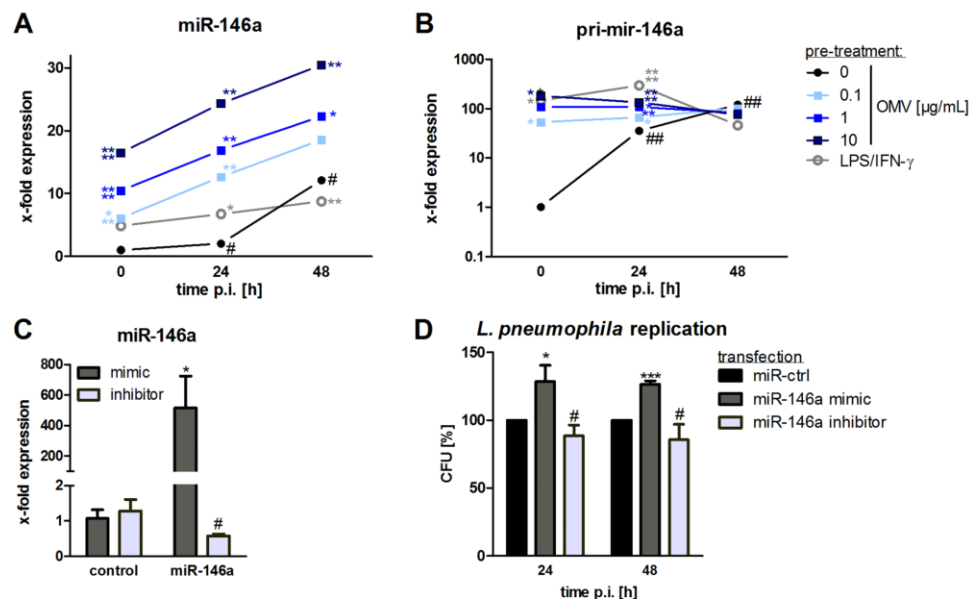


Fig 5. OMVs induce miR-146a upregulation which augments bacterial replication. (A+B) THP-1 cells were pre-incubated with OMVs (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$) or LPS/IFN- γ for 20 h and then infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) for 24 h and 48 h, respectively. qPCR was performed for miR-146a (A) and pri-miR-146a (B). Mean values of three independent experiments are shown. (C+D) THP-1 cells were transfected with miR-146a mimic or inhibitor and corresponding controls. After 24 h of transfection, cells were PMA-differentiated and RNA samples were taken after 24 h incubation. qPCR for miR-146a was performed (C). (D) Transfected THP-1 cells were then additionally infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and lysed for CFU 24 and 48 h p.i., respectively. Results are depicted relative to control transfected cells. Mean values of three independent experiments are shown. **Statistics:** A+B: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to corresponding 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. # $p < 0.05$ compared to equally treated 0 h sample. C+D: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to corresponding control transfected sample. # $p < 0.05$ compared to miR-146a mimic transfection.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g005

infections [43]. After OMV treatment of THP-1 cells, we observed a dose-dependent increase in miR-146a expression (Fig 5A). LPS/IFN- γ treatment also led to an induction of miR-146a, albeit to a weaker extent. When cells were additionally infected with *L. pneumophila*, the expression of miR-146a further increased over the time. Of note, *L. pneumophila* infected cells, which were not pre-treated with OMVs, showed a lower miR-146a expression. The induction of miR-146a could be reduced by blocking TLR2- and NF- κ B-signaling (S8A Fig; 69% reduction and 48% reduction). Furthermore, WT mBMDM showed an induction of miR-146a after OMV stimulation (S8B Fig), which was significantly lower in TLR2^{-/-} (35% less miR-146a). TRIF/MyD88 double knockouts did not express miR-146a after OMV stimulation.

The expression of the primary transcript of miR-146a (pri-miR-146a) is NF- κ B dependent [44]. As we did not observe a further transcriptional induction of the M1 markers following *Legionella* infection of OMV pre-treated THP-1 cells (Fig 3), we asked whether the strong induction of miR-146a was due to transcriptional induction or processing of pri-miR-146a. OMV treatment of THP-1 cells strongly induced the primary transcript, which could not further be induced by *L. pneumophila* infection (Fig 5B). The not pre-treated cells showed a transcriptional induction of pri-miR-146a in response to *L. pneumophila* infection. Thus, transcriptional activation, rather than processing, seems to be responsible for the observed elevated miR-146a levels upon infection. OMV pre-treatment already induced the primary

transcript of miR-146a that is then processed following *L. pneumophila* infection, leading to further increase of the mature miRNA.

The strong expression of miR-146a after OMV stimulation, concomitant with the dependence on active NF- κ B signaling, suggest that the TLR-NF- κ B pathway may play a role in the macrophage response to *L. pneumophila* OMVs. It has been shown that mycobacterial replication in macrophages is facilitated by miR-146a [45]. As we observed an increase in *L. pneumophila* replication following OMV stimulation together with an increase in miR-146a, we transfected miR-146a mimic/inhibitor or a corresponding control and infected the cells with *L. pneumophila*. Overexpression of miR-146a (Fig 5C) resulted in a 20% enhanced *L. pneumophila* number 24 h p.i. which was maintained throughout the experiment (Fig 5D). On the contrary, THP-1 cells transfected with miR-146a inhibitor had significantly less *L. pneumophila* replication than miR-146a overexpressing cells (24 h p.i.: 40%, 48 h p.i.: 41%; Fig 5D), arguing for an involvement of miR-146a in the response of macrophages to *L. pneumophila* OMVs.

IRAK-1 degradation is important for *L. pneumophila* replication after OMV stimulation

One well-described target of miR-146a is the kinase IRAK-1 [43, 46]. Upon TLR2 activation, IRAK-1 mediates downstream signaling, undergoing phosphorylation, polyubiquitination and subsequent degradation [47]. Its 3' UTR can be bound by miR-146a, suppressing its translation. We analyzed IRAK-1 protein expression in OMV stimulated THP-1 cells and observed a strong reduction in IRAK-1 expression after incubation with *L. pneumophila* OMVs (Fig 6A). The infection of OMV pre-treated cells further decreased IRAK-1 protein levels more than *L. pneumophila* infection alone. In contrast, combination of LPS and IFN- γ led to an increase of IRAK-1 on protein (Fig 6A). Furthermore, LPS/IFN- γ pre-treated cells showed a higher IRAK-1 protein expression than OMV pre-treated cells following infection. Quantification of western blots from three independent experiments is shown in S9A and S9B Fig.

As THP-1 cells responded differently to LTA or LPS as a first stimulus before infection with *L. pneumophila*, we analyzed IRAK-1 protein expression after treatment with these TLR ligands. The stimulation of THP-1 cells with LPS for 20 h led to the degradation of 19% of IRAK-1 protein and LTA reduced the IRAK-1 protein level by 17% (S9C and S9D Fig). In contrast, 10 μ g/mL OMVs led to the degradation of 70% IRAK-1 protein, which was maintained throughout the incubation.

As a prolonged absence of IRAK-1 protein seems to be favorable for *L. pneumophila* replication, knockdown experiments for IRAK-1 were performed. The siRNA-mediated knockdown of IRAK-1 led to 50% reduced mRNA and protein levels in comparison to scramble (scr) transfected control cells at the time point of infection (Fig 6B), which remained stable during the time course of the infection (24 h p.i.: 57% reduction; 48 h: 57% reduction). At 24 h p.i., there was no difference in *L. pneumophila* replication compared to scramble control, whereas at 48 h p.i., there was 75% more *L. pneumophila* replication in IRAK-1 silenced cells (Fig 6C).

As IRAK-1 is an essential signaling molecule in TLR/IL-1R signaling, the expression levels of macrophage markers were measured after IRAK-1 silencing. THP-1 cells transfected with siIRAK-1 and infected with *L. pneumophila* showed less expression of markers for classically activated macrophages (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) in comparison to scramble control at 48 h p.i. (Fig 6D–6F), whereas the STAT6-dependent CD206, a marker for alternative activation, remained unchanged (Fig 6G).

These experiments show an involvement of IRAK-1 in the response of macrophages to *L. pneumophila* OMVs and that a decrease of IRAK-1 protein by OMV pre-treatment was associated with enhanced bacterial replication.

experiments are shown. (D-F) qPCR for markers of classically activated macrophages (IL-1 β (D), TNF- α (E), and IL-6 (F)) and alternatively activated macrophages (CD206 (G)) are presented relative to the time point of infection (0 h p.i.) in scramble transfected cells. Mean values of four independent experiments are shown. Statistics: B-G: Mann-Whitney test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to corresponding scramble transfected sample.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g006

Discussion

OMVs are potent pro-inflammatory stimulators of different cell types, carrying endotoxin and additional bacterial antigens [4]. OMVs from *Acinetobacter baumannii* induce cytokine secretion in epithelial cells [48], *Clostridium perfringens* OMVs stimulate the murine macrophage cell line RAW264.7 to produce G-CSF, TNF- α , and IL-6 [6]. *L. pneumophila* also produces OMVs that can be taken up by macrophages and furthermore induce tissue damage in human lung tissue explants [23]. Until now, the majority of OMV studies focused on direct OMV-mediated changes in their target cell/tissue. In this study, we investigated the impact of OMV pre-treatment on a following encounter of macrophages with *L. pneumophila*. THP-1 cells responded upwards of 0.01 $\mu\text{g/mL}$ OMV with IL-8 secretion in a time- and dose-dependent manner. Additionally, the cells secreted IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α dose-dependently. In contrast to THP-1 cells, stimulation of an alveolar type II epithelial cell line with *L. pneumophila* OMVs was reported to require much higher doses to induce pro-inflammatory activation (50 μg in contrast to 0.01 $\mu\text{g/mL}$) [22]. Human primary macrophages induce TNF- α release when exposed to 0.3 $\mu\text{g/mL}$ *L. pneumophila* OMVs [24]. Here, we observed a response intensity to OMVs similar to what others observed when administering whole *L. pneumophila* [42]. Based on LPS-measurements, we assume that the experimentally used OMV doses resemble those that occur under infection conditions.

It has been described that LPS is present on the OMV surface [27, 28]. Therefore, we analyzed the importance of TLR signaling in macrophage activation by OMVs. mBMDMs from TLR2/4 $^{-/-}$ mice showed a reduced CXCL1 secretion upon OMV exposure in comparison to cells from wildtype mice. Our results are in line with the results obtained by Jäger *et al.*, who performed experiments with HEK293 cells overexpressing either TLR2 or TLR4 and observed a stronger response to OMVs when TLR2 was overexpressed [24]. Hence, LPS might be the most important stimulant on OMVs derived from *L. pneumophila*.

The two most important OMV components, LPS and proteins, are both essential for the initial activation of macrophages. The combination of both and the physiological context in which they are recognized seem to determine their effect on the host. This has recently been demonstrated for *Pseudomonas aeruginosa* OMVs [5]. Likewise, knockout mice for either TLR2 or TLR4 still show induction of inflammation in the lungs after being treated with *P. aeruginosa* OMVs [49].

Since *L. pneumophila* OMVs can contain the TLR5-activating fliC [22, 35], we pre-exposed THP-1 cells to OMVs obtained from ΔflaA *L. pneumophila*, but no differences could be observed in comparison to OMVs from wildtype *L. pneumophila*.

The infection of THP-1 with *L. pneumophila* led to an increased expression of classical (M1) macrophage activation markers. However, upon pre-exposure to OMVs, virtually no further increase was observed upon infection with viable bacteria. A reduced macrophage response to classical TLR stimuli has also been observed in a study with *Brucella abortus* OMVs, where THP-1 cells secreted less TNF- α and IL-8 in response to LPS, Pam3Cys and flagellin after OMV challenge [25]. Furthermore, *Porphyromonas gingivalis* OMVs are also reducing the TNF- α response to a second LPS stimulus [26]. We studied the impact of OMVs on a subsequent infection. We did not observe any differences in bacterial uptake capacity. However, 24 h post infection, OMV pre-treatment led to a reduction of bacterial replication in a similar range as LPS/IFN- γ pre-exposure. LPS/IFN- γ is an inducer of the M1 phenotype, which is capable of

enhanced bacterial killing [29]. This restrictive effect on *Legionella* replication seems to depend in part on both OMV-transported proteins and TLR2 ligands, as it could be neutralized by heat exposure or treatment with a TLR2 blocking antibody, and mimicked by TLR2 activation. In addition, the early growth restriction could be reverted by inhibition of the canonical NF- κ B pathway, because *L. pneumophila* needs the transcriptional induction of anti-apoptotic NF- κ B target genes [42, 50]. In contrast to the early time point of infection (24 h p.i.), we observed a boosting effect of OMV pre-treatment on bacterial replication at 48 h time point, both in THP-1 cells and primary mBMDM of wildtype mice. Induction of bacterial replication after OMV treatment has also been observed in a study with *Mycobacterium bovis* in mice [51]. There, challenging mice with OMVs prior to an infection led to a doubling in bacterial load in the lungs and more spreading of the bacteria to the spleen. In contrast to the early restrictive effect on *Legionella* replication, the subsequently observed boost in replication seems not to rely on proteins or nucleic acids transported by OMVs and could not be mimicked by LPS or LTA preparations. However, the OMV-induced increase in *L. pneumophila* replication at the later time point was completely abolished by TLR2 knockout, TRIF/MyD88 double knockout, or inhibition of the canonical NF- κ B pathway. Interestingly, OMV pre-treatment of macrophages before the infection with a dot/icm mutant of *Legionella* (Δ dotA), which is not capable of forming a LCV under normal conditions [17, 30], enables this mutant to replicate in THP-1 cells. Furthermore, the increased *L. pneumophila* replication was lost when OMVs were incubated with a membrane-permeabilizing agent, implicating that not only LPS on the OMV surface is critical for the observed effect, but also the context in which it is presented. Ellis *et al.* made similar observations with OMVs from *P. aeruginosa* [5]. LPS, which is important for binding of the OMV to the macrophage surface, or proteins, which are required for the internalization, are not sufficient alone. The observation that LPS aggregate size influences its internalization [52] and that vesicular LPS has a higher potency to activate macrophages [5], supports the concept that the three-dimensional structure of the vesicles impacts the response. Our results support the model that the response of inflammatory cells depends of the context in which LPS is presented [53].

L. pneumophila critically depends on establishing a fine balance between avoiding the immune response and successful infection. Pro-inflammatory cytokines and anti-apoptotic proteins are equally induced after *L. pneumophila* infection and are both dependent on p65 translocation into the nucleus [35, 42], which we observed after short time of OMV incubation. *L. pneumophila* itself can establish a phosphorylation of I κ B α at ser-52 and ser-36 by LnaB and LegK1 which mimic eukaryotic serine/threonine kinases; this again leads to an IKK independent and robust induction of apoptosis antagonist genes as well as pro-inflammatory genes [54, 55]. As *L. pneumophila* activates NF- κ B signaling itself and critically depends on this signaling as demonstrated by CFU assay with the IKK inhibitor, we conclude that macrophages might be a better replication niche for *L. pneumophila* when NF- κ B signaling has already been induced by a first stimulus. There was no complete loss of bacterial replication observed upon IKK-inhibitor treatment, since SAPK/JNK and p38 signaling are still intact and also support *L. pneumophila* replication [56].

At a late time point during infection, OMV pre-treated cells showed better survival than not pre-treated macrophages. This might be a result of the activation of anti-apoptotic signaling via NF- κ B, as we found increased BCL2A1 expression after OMV exposure. This BCL2 family member can be induced by GM-CSF, LPS, or TNF- α [57–59] via the transcription factor NF- κ B [60]. The expression of anti-apoptotic BCL2A1 is in line with the survival advantage of OMV-treated cells when infected with *L. pneumophila*. However, caspase inhibition did not alter bacterial replication.

The *L. pneumophila* replication cycle in eukaryotic cells ends with host cell apoptosis and bacterial egress [41, 61], but here we observed an increase in bacterial replication after OMV

incubation concomitant with a higher rate of cell viability. In addition to this, we found that OMV pre-treatment led to an increased number of vacuoles per cell, suggesting that exposure to OMVs rendered human macrophages more susceptible to intracellular *L. pneumophila* replication.

TLR and NF- κ B signaling are tightly controlled not only by posttranslational modifications of involved proteins, but also by miRNAs that act on the 3' UTR of mRNAs and lead to their translational repression [62]. *L. pneumophila* OMVs increase the levels of miR-146a by induction of its primary transcript, pri-mir-146a via TLR2 and NF- κ B. This anti-inflammatory miRNA is involved in the intracellular replication of *Mycobacterium bovis* in macrophages [45]. We show that the artificial overexpression of miR-146a prior to *L. pneumophila* infection results in enhanced bacterial replication whereas the knockdown of this miRNA decreases the replication. This loss-of-function effect was not very strong in CFU assay, presumably because a functional knockdown of a microRNA as highly abundant as miR-146a is difficult to achieve. In addition, we are measuring a sum signal of only partly transfected cells. Moreover, the transfection of microRNAs can alter the loading of endogenous miRNAs into the microRNA processing machinery [63] and this could influence mRNA targets that we did not investigate.

The effect on bacterial replication of miR-146a in *M. bovis* infection has been linked to IRAK-1, which is a well-studied target of this miRNA [45]. IRAK-1 is essential in TLR and IL-1R signaling, as it mediates the downstream activation of NF- κ B [47]. As we observed a long lasting IRAK-1 simultaneously with p65 nuclear translocation, we hypothesized that it is involved in the replication enhancing effect observed by OMV pre-treatment of macrophages. Knockdown of IRAK-1 by siRNA increased *L. pneumophila* replication and mimicked the effect observed with OMVs. Exposure of THP-1 cells to OMVs led to stronger effects on *L. pneumophila* replication than IRAK-1 knockdown, probably due to the moderate knockdown efficiency. Markers for classical macrophage activation were also reduced in siIRAK-1 transfected cells, similarly to OMV pre-treatment. It has been previously shown that LPS exposure can desensitize cells for a second LPS challenge by miR-146a upregulation, IRAK-1 degradation and translational repression of IRAK1 mRNA, which then results in a reduced cytokine response to the second LPS stimulus [64]. TLR2 or TLR4 activation alone did not mimic the full repertoire of *L. pneumophila* OMV exposure, probably because it results in much higher remaining IRAK-1 protein levels than OMV pre-treatment, even though the LPS doses were comparable (200 ng/ml *S. minnesota* LPS was used and 1 μ g/mL OMV contains 220 ng/mL LPS). Contrasting OMV treatment, LPS/IFN- γ even induced IRAK-1 on protein level and led to reduced *L. pneumophila* replication in THP-1 cells.

Our results and the cited studies point towards an immunomodulatory action of OMVs, which might help the bacteria evading the host immune system. To our knowledge, our report is the first to describe the phenomenon of an OMV-induced replication advantage of *L. pneumophila*. *Legionella* has developed several sophisticated strategies to ensure its replication and spreading by evading the host immune system. They hijack key cellular processes to avoid lysosomal degradation after phagocytosis, and they interfere with host vesicular trafficking, ubiquitination and autophagy [17, 65, 66]. In doing so, *L. pneumophila* gains control over the host innate immune response. The activation of NF- κ B signaling, by either OMVs or whole bacteria, leads to secretion of pro-inflammatory cytokines, which likely results in the recruitment of new potential host cells to the site of infection, which then can be infected. The increased infection of macrophages in the presence of OMVs might therefore be an important pathogenic strategy of *L. pneumophila*.

Taken together, this study has demonstrated for the first time that OMVs directly influence the course of *Legionella* infection by activating macrophages in a pro-inflammatory way and at the same time promoting bacterial replication (Fig 7). This property seems to depend on

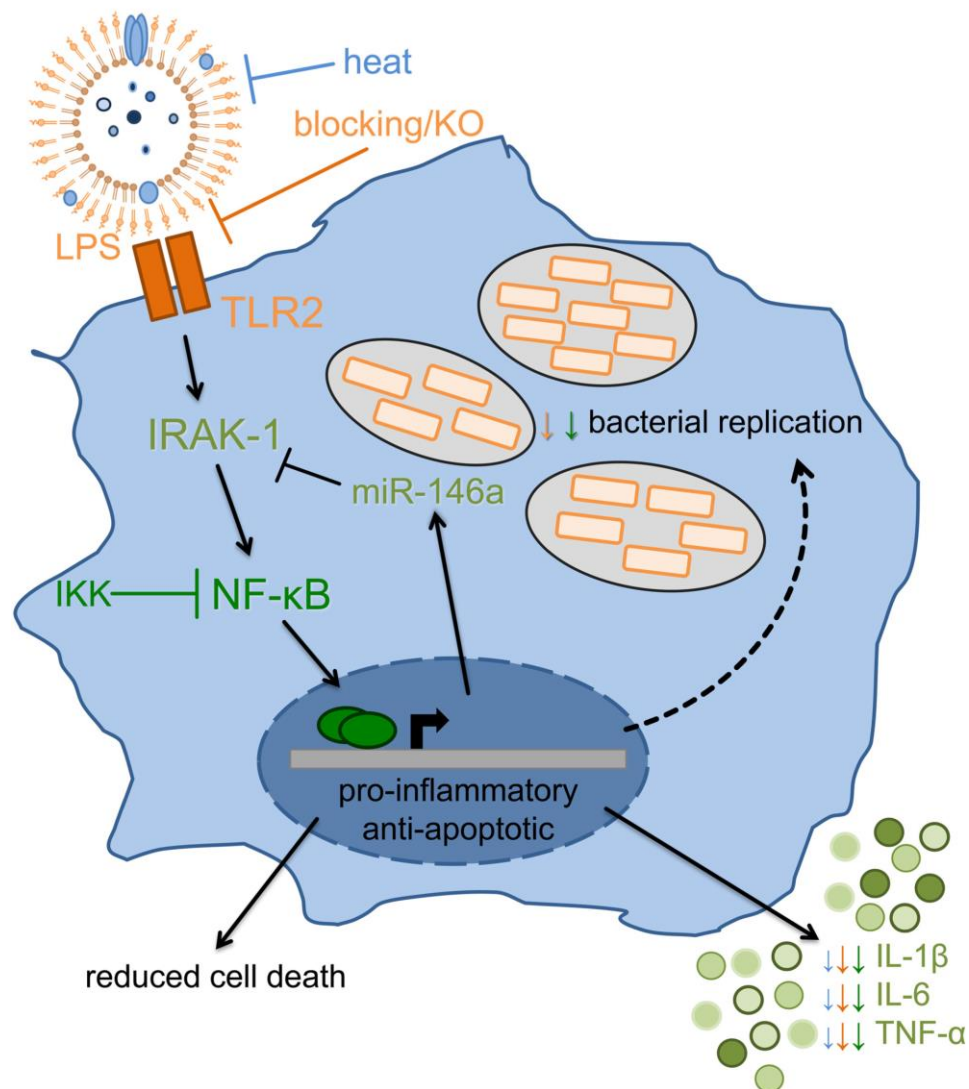


Fig 7. Response of macrophages to OMVs. Macrophages sense *L. pneumophila* OMVs via TLR2, which is critical for the initial activation of macrophages, and which results in IRAK-1 degradation. The downstream NF- κ B nuclear translocation and signaling is essential for the induction of cytokine gene expression and miR-146a induction. A subsequent infection of OMV pre-treated macrophages with *Legionella* results in a higher rate of bacterial replication concurrent with more vacuoles per cell. While pro-inflammatory gene expression caused by OMVs cannot be further enhanced by *L. pneumophila* infection, there is induced transcription of anti-apoptotic genes. This results in increased viability of infected cells. Prolonged IRAK-1 absence, via protein degradation and suppressed translation by miR-146a, leads to a more efficient replication of *L. pneumophila*.

doi:10.1371/journal.ppat.1005592.g007

TLR2- and NF- κ B-dependent miR-146a upregulation and consequently prolonged IRAK-1 depletion. Thereby, OMVs could facilitate replication and spreading of *L. pneumophila* in the human lung.

Materials and Methods

Chemicals and antibodies

RPMI-1640, FCS, phalloidin Alexa Fluor 546 and goat anti-mouse Alex Fluor 488 were obtained from LifeTechnologies (Darmstadt, Germany). PBS was from Biochrom GmbH (Berlin, Germany). PMA was purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). LTA was from InvivoGen (Toulouse, France). DAPI was from AAT Bioquest (Sunnyvale, USA). IKK inhibitor XIII was obtained from EMD Millipore Corporation (Billerica, USA). zVAD-fmk was obtained from AdipoGen (Liestal, Switzerland). *Salmonella minnesota* LPS was from Enzo Life Sciences (Lörrach, Germany). Human recombinant IFN- γ was obtained from PromoKine (Heidelberg, Germany). TLR2 blocking antibody was acquired from eBioscience (T2.5, San Diego, USA). Anti-LPS antibody (*L. pneumophila* specific; ABIN235748) was obtained from antikörper-online.de (Aachen, Germany). Anti-IRAK-1 antibody was purchased from Cell Signaling (4359S), anti-tubulin antibody was from Santa Cruz (sc-5286) as well as p65 antibody (sc-372) and β -actin antibody (sc-1616). All chemicals used were of analytical grade and obtained from commercial sources.

L. pneumophila culture and OMV preparation

Legionella pneumophila strain Corby wildtype was grown on buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar at 37°C for three days. For OMV preparation, *L. pneumophila* were transferred from BCYE agar plates into sterile yeast extract broth (YEB) medium at a density of 1×10^8 bacteria per mL. Bacteria were incubated in a shaking incubator (MaxQ 6000, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) at 37°C until they reached early stationary phase. Pure *L. pneumophila* cultures were then spun down three times (4,500 x g, 15 min, 4°C; Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific). To remove remaining bacteria, the supernatant was passed twice through a 0.22 μ m sterile filter. The supernatant was then ultracentrifuged (100,000 x g, 3 h, 4°C). After washing the obtained OMV pellet with sterile PBS to remove contaminating free protein, it was again ultracentrifuged and then resuspended in sterile PBS and stored at -20°C. The protein content of the preparations was determined by Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific), and equal protein amounts were used for cell stimulation. For protein denaturation, OMVs were incubated at 60°C for 5 min as previously described [33].

Cell culture and *L. pneumophila* infection

The human monocytic cell line THP-1 was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultivated in RPMI-1640 with supplements and 10% FCS in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. THP-1 cells were differentiated into a macrophage-like phenotype using 20 nM PMA for 24 h and then plated at the desired density. For all infection experiments, differentiated THP-1 cells were infected with WT *L. pneumophila* with a multiplicity of infection (MOI) of 0.5. For infection experiments of mBMDM *L. pneumophila* Δ flaA were used at an MOI of 0.5.

Murine bone marrow derived monocytes were isolated from tibiae and femora of wildtype, TLR2^{-/-}, TLR2/4^{-/-} or TRIF/MyD88^{-/-} mice (C57BL/6N). For each experiment, cells were differentiated into macrophages in the presence of M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). After 72 h of incubation, M-CSF was added again, and cells were incubated for additional 48 h.

Differentiated cells were detached and re-plated at the desired density in the presence of GM-CSF. After 24 h, cells were used for experiments.

Transfection of THP-1 cells

Transfection of THP-1 cells with miRNA mimics or inhibitors was performed with siPORT NeoFX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. mirVana mimics and inhibitors for miR-146a and corresponding controls were purchased from Thermo Fisher Scientific. Following the manufacturer's protocol, siRNA transfection was performed by using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Silencer select siRNA targeting IRAK-1 mRNA and a corresponding scramble control were purchased from Thermo Fisher Scientific.

OMV stimulation of macrophages

Differentiated THP-1 or mBMDM were stimulated with different doses of OMVs (0.01–25 µg/mL as determined by the protein concentration of the OMV preparation). Cells were incubated with OMVs for 24 or 48 h. In all infection experiments OMV pre-incubation was carried out for 20 h and then the infection followed for up to 48 h. LPS (200 ng/mL) alone or in combination with IFN-γ (200 ng/mL) or LTA (1 µg/mL) were alternatively used to pre-stimulate THP-1 cells for 20 h before the infection with *L. pneumophila*. To assess the influence of TLR2 signaling, a TLR2 blocking antibody was added to the cells 90 min before OMV stimulation at a final concentration of 20 µg/mL. NF-κB inhibition was achieved by incubation with 1 µM IKK XIII inhibitor prior to treatment. The influence of nucleic acids in the OMVs on *L. pneumophila* replication was analyzed by digestion of OMVs with RNase A (0.2 µg/µL) and RNase III (0.02 U/µL) in combination or DNase I (0.004 U/µL). OMVs were incubated for 1 h at 37°C with the enzymes alone or in combination with 0.3% Triton X-100 to permeabilize the OMV membrane (final concentration in the cell culture well: 0.75 ‰).

Colony forming unit assay (CFU)

To analyze bacterial replication in THP-1 cells, cells were pre-stimulated with rising doses of OMVs or left untreated and subsequently infected with *L. pneumophila*. To quantify the bacterial load, cells were lysed at indicated time points with saponin (0.1% in the supernatant) and different dilutions of the lysates were streaked on BCYE agar plates. After three days of incubation at 37°C, *L. pneumophila* colonies were counted and the bacterial load was calculated.

ELISA

IL-8 or CXCL1 from the cell-free supernatant of THP-1 or mBMDM was analyzed with commercial ELISA kits (IL-8: OptEIA, BD Biosciences, Heidelberg, Germany; CXCL1: DuoSet, R&D, Minneapolis, USA). All other secreted cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1, GM-CSF) were measured with a Luminex Assay (R&D) in a Bio-Plex Magpix (Luminex Corporation, Austin, USA) according to the manufacturer's instructions.

RNA preparation and real-time PCR

For analysis of gene expression, total RNA isolation was carried out by phenol-chloroform extraction with Isol RNA lysis reagent (5Prime, Hamburg, Germany). For the detection of pri-miRNAs, purified RNA was DNase I digested (Roche, Mannheim, Germany). After reverse transcription (High-Capacity RNA-to-cDNA kit or TaqMan miRNA reverse transcription kit, both Thermo Fisher Scientific), quantitative real-time PCR was performed in a ViiA7 (Thermo

Fisher Scientific) with Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and specific primer pairs. miRNA expression was analyzed with TaqMan assays detecting miR-146a, pri-mir-146a, pri-mir-16-2 and RNU48 (Thermo Fisher Scientific).

BCL2A1: fwd: 5'-GGCCCACAAGAAGAGGAAAATG-3', rev: 5'-GGAGTGTCTTTCTGGTCAACA-3'

CD206: fwd: 5'-CAGCGCTTGTGATCTTCATT-3', rev: 5'-TACCCCTGCTCCTGGTTT-3'

IL-1 β : fwd: 5'-AGCTCGCCAGTGAAATGATGG-3', rev: 5'-CAGGTCCTGGAAGGAGCACTTC-3'

IL-6: fwd: 5'-AATTCGGTACATCCTCGACGG-3', rev: 5'-TTGGAAGGTTTCAGGTTGTTTCT-3'

IRAK-1: fwd: 5'-TGAGGAACACGGTGTATGCTG-3', rev: 5'-GTTTGGGTGACGAAACCTGGA-3'

RPS18: fwd: 5'-GCGGCGGAAAATAGCCTTTG-3', rev: 5'-GATCACACGTTCCACCTCATC-3'

TNF- α : fwd: 5'-GCTGCACTTTGGAGTGATCG-3', rev: 5'-TCACTCGGGGTTTCGAGAGA-3'

MTT

Cells were seeded into microtiter plates and incubated with rising amounts of OMVs before infection with *L. pneumophila*. At indicated time points, 10 μ L thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) was added to the cells and incubated for another 2 h at 37°C. Medium was removed and replaced with EtOH:DMSO (1:2). After shaking, absorption was measured at 570 nm.

Immunofluorescence

THP-1 cells were seeded on coverslips and infected with *L. pneumophila* for 48 h with or without OMV pre-incubation. After 15 min fixation with 4% paraformaldehyde, slides were washed three times with PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in TBS. Blocking was carried out with 10% FCS for 90 min. Incubation with α -LPS (1:500, in blocking solution) was followed by α -mouse (1:1000, in blocking solution) in combination with DAPI (1:2000) and phalloidin Alexa Fluor 546 (1:40). Stainings were analyzed on a fluorescence microscope (Axio Vision, Zeiss, Jena, Germany).

Ethical statement

All animals were handled according to national and European legislation, namely the EU council directive 86/609/EEC for the protection of animals. The performed protocols were approved by the responsible animal ethics committee (Philipps-University Marburg; permit number: EX-22-2013).

Statistics

Data are shown as mean values \pm SEM for at least three biologically independent experiments. Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA) was used. The non-parametric Mann-Whitney test was performed for unpaired samples. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. If not indicated otherwise, tests were performed vs. corresponding control (*).

Supporting Information

S1 Fig. Cell viability after OMV treatment. THP-1 cells were treated with different doses of OMVs (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for up to 96 h. Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to untreated control cells at every time point. Results are presented as mean values of four independent experiments, each performed in technical triplicates. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. (TIF)

S2 Fig. *L. pneumophila* replication in THP-1 cells. (A) THP-1 cells were infected with *L. pneumophila* at an MOI of 0.5 and bacterial replication was determined by CFU assay. Cells were lysed after the indicated time points. Shown are mean values of three independent experiments each performed in duplicates. (B) *L. pneumophila* uptake in THP-1 cells after pre-treatment with OMVs (0.1, 1 or 10 $\mu\text{g/mL}$) or LPS/IFN- γ is shown by CFU assay; not pre-treated cells served as a control. Shown are mean values of three independent experiments, each performed in duplicates. (C) Bacterial replication of *L. pneumophila* ΔdotA was analyzed in THP-1 cells with OMV pre-treatment (WT *L. pneumophila*) by CFU assay 24 and 48 h p.i.. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Shown are mean values of three independent experiments, each performed in duplicates. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs, ns = not significant. (TIF)

S3 Fig. Influence of OMV proteins and TLR2 activation on *L. pneumophila* replication. (A) THP-1 cells were pre-incubated with heat inactivated and intact OMVs (1 $\mu\text{g/mL}$ each) 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Bacterial replication was determined by CFU assay. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Mean values of three independent experiments are shown. (B-F) THP-1 cells were pre-incubated with TLR2 blocking antibody or a control (20 $\mu\text{g/mL}$ each) 90 min before OMV stimulation (1 $\mu\text{g/mL}$). After 20 h of OMV incubation, cells were infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and lysed for CFU 24 and 48 h p.i. (B). Pre-treatment with LTA (1 $\mu\text{g/mL}$) or LPS (200 ng/mL) served as a control. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Mean values of three independent experiments, each performed in duplicates, are shown. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h) or 24 and 48 h p.i.. qPCR was performed for IL-1 β (C), TNF- α (D), IL-6 (E), and CD206 (F). Results are calculated relative to the time point of infection (0 h) with 1 $\mu\text{g/mL}$ OMV treatment. Mean values of three independent experiments are shown. Symbol key from S3B Fig is used also in S3C–S3F Fig. (G) *Legionella* replication was determined by CFU assay in mBMDM. Cells from WT, TLR2 $^{-/-}$ and TRIF/MyD88 $^{-/-}$ mice were pre-treated with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ OMV for 20 h and then infected with *L. pneumophila* ΔflaA (MOI 0.5) for 48 h. Bars represent mean values of three biological independent experiments, each performed in duplicates. Statistics: A: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to corresponding 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. B: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ compared to corresponding 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. # $p < 0.05$ compared to 1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. C-F: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to corresponding 1 $\mu\text{g/mL}$ OMVs. G: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to WT. (TIF)

S4 Fig. Increased *L. pneumophila* replication depends on OMV membrane integrity and not on flagellin. A) THP-1 cells were pre-incubated for 20 h with OMVs (1 $\mu\text{g/mL}$) from wild-type *Legionella* or *Legionella* lacking flagellin (ΔflaA) and were then infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Bacterial replication after OMV pre-stimulation was determined by CFU assay 24 and 48 h p.i.. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but

infected) cells. B) THP-1 cells were treated with OMVs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) which were either untreated or treated with RNase (RNase A and RNase III in combination) or DNase alone, respectively, or in combination with Triton X-100 (0.3%). After 20 h pre-incubation, cells were infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and bacterial replication was assessed by CFU assay 24 and 48 h p.i.. *L. pneumophila* replication is presented relative to not pre-treated but infected cells. Bars show mean values of three independent experiments, each performed in duplicates. Statistics: A) Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs. B) Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to corresponding OMV treated sample. (TIF)

S5 Fig. Nuclear shuttling of p65 after OMV treatment. THP-1 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs for 30 min or left untreated as a control. Protein extracts from nucleus and cytosol were generated and the localization of p65 was determined by western blot. Lamin C served as a nuclear loading control and β -actin as a cytosolic loading control. One representative result is shown. (TIF)

S6 Fig. Cell viability after IKK inhibitor treatment. THP-1 cells were treated with IKK inhibitor (1 μM) or DMSO as a solvent control 90 min before addition of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs for 20 h in the indicated samples. Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs. Bars represent mean values of three independent experiments, each performed in triplicates. Statistics: Mann-Whitney test; ns = not significant. (TIF)

S7 Fig. OMV pre-treatment increases cell viability throughout a following infection. (A) THP-1 cells were pre-treated with OMVs (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs at every time point. Results are shown as mean values of four independent experiments, each performed in technical triplicates. (B) OMV-treated THP-1 cells (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or control cells were infected with *L. pneumophila* for 24 or 48 h at an MOI of 0.5, respectively. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h) or 24 and 48 h p.i.. qPCR was performed for BCL2A1 and results are normalized to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs at 0 h p.i.. (C) THP-1 cells were treated with zVAD-fmk (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or DMSO as a solvent control for 90 min before the infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5) for 24 and 48 h. Bacterial replication was analyzed by CFU assay. Results are present relative to not pre-treated but infected control cells. Bars represent mean values of four biological independent experiments, each performed in duplicates. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ compared to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs or DMSO; ns = not significant. (TIF)

S8 Fig. miR-146a induction depends on TLR- and NF- κ B-signaling. (A) THP-1 cells were pre-treated with TLR2 blocking antibody (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or IKK inhibitor (1 μM) 90 min before addition of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs. Cells were infected after 20 h of OMV stimulation for 24 and 48 h. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h), and 24 and 48 h p.i. and the expression of miR-146a was analyzed. Bars represent x-fold expression and are normalized to untreated control cells. Shown are mean values of three biological independent experiments. (B) miR-146a expression was analyzed in mBMDM (WT, TLR2^{-/-}, TRIF/MyD88^{-/-}) after the treatment with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs for 20 h. Graph represents x-fold expression in comparison to untreated control cells. Bars are mean values of three biological independent experiments. Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to WT. (TIF)

S9 Fig. Varying IRAK-1 degradation after different treatments. (A-B) Three independent experiments as shown in Fig 6A were quantified and the results normalized to untreated control cells. IRAK-1 degradation after (A) OMV or LPS/IFN- γ stimulation without infection and (B) pre-stimulation plus infection with *L. pneumophila* are shown. (C) IRAK-1 degradation is shown after pre-treatment of THP-1 cells with LPS (200 ng/mL) or LTA (1 μ g/mL) 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5) at the time point of infection (0 h) and 24 and 48 h p.i. One representative experiment out of three biological independent experiments is shown. (D) Comparison of remaining IRAK-1 protein levels after the different treatments (OMV, LTA, LPS) from S9A and S9C Fig. Mean values of three independent experiments are shown. Statistics: (A-B) Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to 0 μ g/mL OMVs. # $p < 0.05$ compared to LPS/IFN- γ treated cells. (TIF)

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Markus Schnare for providing us with TLR2^{-/-} and TLR2/4^{-/-} mice and Prof. Dr. Carsten Kirschning for TRIF/Myd88^{-/-} mice. We are grateful to Kerstin Hoffmann for her outstanding technical support. Part of this work will be part included in the doctoral thesis of Anna Lena Jung.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ALJ CSt. Performed the experiments: ALJ CSt CEH. Analyzed the data: ALJ CSc WB BS. Contributed reagents/materials/analysis tools: ALJ CSt CEH CSc WB BS. Wrote the paper: ALJ CSc WB BS.

References

1. Cambronne E. D. and Roy C. R.. 2006. Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic* (Copenhagen, Denmark). 7(8):929–939.
2. Ellis T. N. and Kuehn M. J.. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 74(1):81–94. doi: [10.1128/MMBR.00031-09](https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09) PMID: [20197500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20197500/)
3. Beveridge T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*. 181(16):4725–4733. PMID: [10438737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10438737/)
4. Kuehn M. J. and Kesty N. C.. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & development*. 19(22):2645–2655.
5. Ellis T. N., Leiman S. A. and Kuehn M. J.. 2010. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infection and immunity*. 78(9):3822–3831. doi: [10.1128/IAI.00433-10](https://doi.org/10.1128/IAI.00433-10) PMID: [20605984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20605984/)
6. Jiang Y., Kong Q., Roland K. L. and Curtiss R. 3rd. 2014. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 304(3–4):431–443. doi: [10.1016/j.ijmm.2014.02.006](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.006) PMID: [24631214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631214/)
7. Whitmire W. M. and Garon C. F.. 1993. Specific and nonspecific responses of murine B cells to membrane blebs of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*. 61(4):1460–1467. PMID: [8454350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8454350/)
8. Ismail S., Hampton M. B. and Keenan J. I.. 2003. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infection and immunity*. 71(10):5670–5675. PMID: [14500487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500487/)
9. Chi B., Qi M. and Kuramitsu H. K.. 2003. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Research in microbiology*. 154(9):637–643. PMID: [14596901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14596901/)
10. Kolling G. L. and Matthews K. R.. 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*. 65(5):1843–1848. PMID: [10223967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223967/)

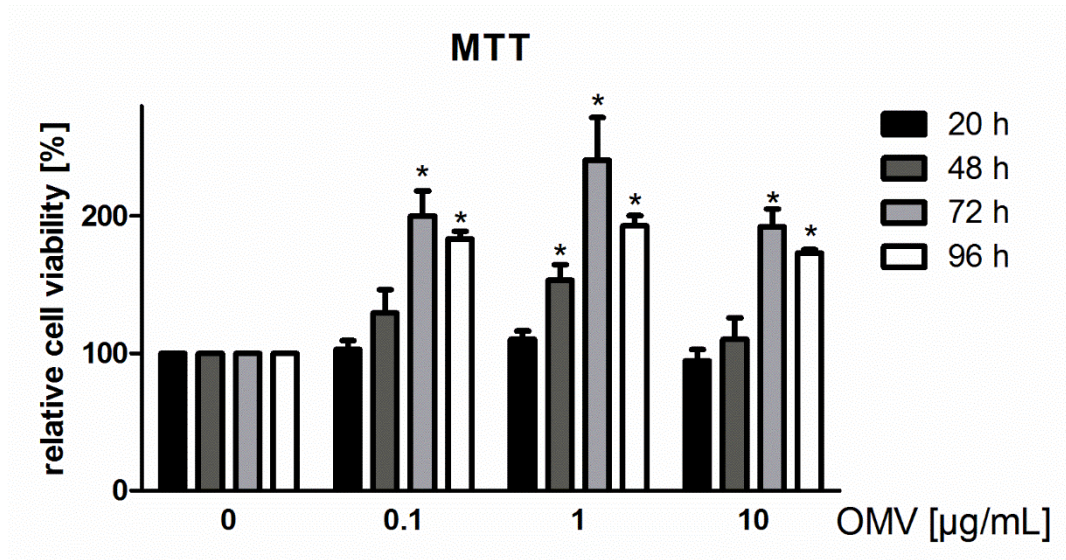
11. Horstman A. L. and Kuehn M. J.. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry*. 275(17):12489–12496. PMID: [10777535](#)
12. Dorward D. W., Schwan T. G. and Garon C. F.. 1991. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *Journal of clinical microbiology*. 29(6):1162–1170. PMID: [1864935](#)
13. Abu Kwaik Y., Gao L. Y., Stone B. J., Venkataraman C. and Harb O. S.. 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and environmental microbiology*. 64(9):3127–3133. PMID: [9726849](#)
14. Winn W. C. Jr. and Myerowitz R. L.. 1981. The pathology of the *Legionella pneumonias*. A review of 74 cases and the literature. *Human pathology*. 12(5):401–422. PMID: [6166529](#)
15. Benoit M., Desnues B. and Mege J. L.. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950). 181(6):3733–3739.
16. Ge J. and Shao F.. 2011. Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by *Legionella* Dot/Icm effectors. *Cellular microbiology*. 13(12):1870–1880. doi: [10.1111/j.1462-5822.2011.01710.x](#) PMID: [21981078](#)
17. Hubber A. and Roy C. R.. 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annual review of cell and developmental biology*. 26:261–283. doi: [10.1146/annurev-cellbio-100109-104034](#) PMID: [20929312](#)
18. Fernandez-Moreira E., Helbig J. H. and Swanson M. S.. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infection and immunity*. 74(6):3285–3295. PMID: [16714556](#)
19. DebRoy S., Dao J., Soderberg M., Rossier O. and Cianciotto N. P.. 2006. *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(50):19146–19151. PMID: [17148602](#)
20. Vincent C. D., Friedman J. R., Jeong K. C., Buford E. C., Miller J. L. and Vogel J. P.. 2006. Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Molecular microbiology*. 62(5):1278–1291. PMID: [17040490](#)
21. Tyson J. Y., Pearce M. M., Vargas P., Bagchi S., Mulhern B. J. and Cianciotto N. P.. 2013. Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*. *Infection and immunity*. 81(5):1399–1410. doi: [10.1128/IAI.00045-13](#) PMID: [23429532](#)
22. Galka F., Wai S. N., Kusch H., Engelmann S., Hecker M., Schmeck B., Hippenstiel S., Uhlin B. E. and Steinert M.. 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infection and immunity*. 76(5):1825–1836. doi: [10.1128/IAI.01396-07](#) PMID: [18250176](#)
23. Jager J., Marwitz S., Tiefenau J., Rasch J., Shevchuk O., Kugler C., Goldmann T. and Steinert M.. 2014. Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infection and immunity*. 82(1):275–285. doi: [10.1128/IAI.00703-13](#) PMID: [24166955](#)
24. Jager J., Keese S., Roessle M., Steinert M. and Schromm A. B.. 2014. Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cellular microbiology*.
25. Pollak C. N., Delpino M. V., Fossati C. A. and Baldi P. C.. 2012. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One*. 7(11):e50214. doi: [10.1371/journal.pone.0050214](#) PMID: [23189190](#)
26. Duncan L., Yoshioka M., Chandad F. and Grenier D.. 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microbial pathogenesis*. 36(6):319–325. PMID: [15120158](#)
27. Shim H. K., Kim J. Y., Kim M. J., Sim H. S., Park D. W. and Sohn J. W.. 2009. *Legionella* lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Experimental & molecular medicine*. 41(10):687–694.
28. Akamine M., Higa F., Arakaki N., Kawakami K., Takeda K., Akira S. and Saito A.. 2005. Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*. 73(1):352–361. PMID: [15618172](#)
29. Santic M., Molmeret M. and Abu Kwaik Y.. 2005. Maturation of the *Legionella pneumophila*-containing phagosome into a phagolysosome within gamma interferon-activated macrophages. *Infection and immunity*. 73(5):3166–3171. PMID: [15845527](#)

30. Bartfeld S., Engels C., Bauer B., Aurrass P., Flieger A., Bruggemann H. and Meyer T. F.. 2009. Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by Legionella pneumophila. *Cellular microbiology*. 11(11):1638–1651. doi: [10.1111/j.1462-5822.2009.01354.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01354.x) PMID: [19573161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19573161/)
31. Mosser D. M. and Edwards J. P.. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 8(12):958–969. doi: [10.1038/nri2448](https://doi.org/10.1038/nri2448) PMID: [19029990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029990/)
32. Gordon S. and Taylor P. R.. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 5(12):953–964. PMID: [16322748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322748/)
33. McCaig W. D., Koller A. and Thanassi D. G.. 2013. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by Francisella novicida. *Journal of bacteriology*. 195(6):1120–1132. doi: [10.1128/JB.02007-12](https://doi.org/10.1128/JB.02007-12) PMID: [23264574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23264574/)
34. Shevchuk O., Jager J. and Steinert M.. 2011. Virulence properties of the legionella pneumophila cell envelope. *Frontiers in microbiology*. 2:74. doi: [10.3389/fmicb.2011.00074](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00074) PMID: [21747794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21747794/)
35. Schmeck B., N'Guessan P. D., Ollomang M., Lorenz J., Zahlten J., Opitz B., Flieger A., Suttrop N. and Hippenstiel S.. 2007. Legionella pneumophila-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *The European respiratory journal*. 29(1):25–33. PMID: [16971406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16971406/)
36. Ghosal A., Upadhyaya B. B., Fritz J. V., Heintz-Buschart A., Desai M. S., Yusuf D., Huang D., Baumuratov A., Wang K., Galas D. and Wilmes P.. 2015. The extracellular RNA complement of Escherichia coli. *MicrobiologyOpen*.
37. Sjöström A. E., Sandblad L., Uhlin B. E. and Wai S. N.. 2015. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Scientific reports*. 5:15329. doi: [10.1038/srep15329](https://doi.org/10.1038/srep15329) PMID: [26483327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26483327/)
38. Kawai T. and Akira S.. 2007. TLR signaling. *Seminars in immunology*. 19(1):24–32. PMID: [17275323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17275323/)
39. Hempstead A. D. and Isberg R. R.. 2013. Host signal transduction and protein kinases implicated in Legionella infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 376:249–269. doi: [10.1007/82_2013_342](https://doi.org/10.1007/82_2013_342) PMID: [23918173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23918173/)
40. Kucharczak J., Simmons M. J., Fan Y. and Gelinas C.. 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer—role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22(56):8961–8982. PMID: [14663476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663476/)
41. Abu-Zant A., Santic M., Molmeret M., Jones S., Helbig J. and Abu Kwaik Y.. 2005. Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of Legionella pneumophila. *Infection and immunity*. 73(9):5339–5349. PMID: [16113249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16113249/)
42. Losick V. P. and Isberg R. R.. 2006. NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by Legionella pneumophila. *The Journal of experimental medicine*. 203(9):2177–2189. PMID: [16940169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940169/)
43. Saba R., Sorensen D. L. and Booth S. A.. 2014. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Frontiers in immunology*. 5:578. doi: [10.3389/fimmu.2014.00578](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00578) PMID: [25484882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25484882/)
44. Taganov K. D., Boldin M. P., Chang K. J. and Baltimore D.. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(33):12481–12486. PMID: [16885212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885212/)
45. Li S., Yue Y., Xu W. and Xiong S.. 2013. MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PLoS One*. 8(12):e81438. doi: [10.1371/journal.pone.0081438](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081438) PMID: [24358114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358114/)
46. Hou J., Wang P., Lin L., Liu X., Ma F., An H., Wang Z. and Cao X.. 2009. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 183(3):2150–2158.
47. Flannery S. and Bowie A. G.. 2010. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochemical pharmacology*. 80(12):1981–1991. doi: [10.1016/j.bcp.2010.06.020](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.020) PMID: [20599782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20599782/)
48. Jun S. H., Lee J. H., Kim B. R., Kim S. I., Park T. I., Lee J. C. and Lee Y. C.. 2013. Acinetobacter baumannii outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One*. 8(8):e71751. doi: [10.1371/journal.pone.0071751](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071751) PMID: [23977136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23977136/)
49. Park K. S., Lee J., Jang S. C., Kim S. R., Jang M. H., Lotvall J., Kim Y. K. and Cho Y. S.. 2013. Pulmonary inflammation induced by bacteria-free outer membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 49(4):637–645. doi: [10.1165/rcmb.2012-0370OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0370OC) PMID: [23713467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23713467/)
50. Abu-Zant A., Jones S., Asare R., Suttles J., Price C., Graham J. and Kwaik Y. A.. 2007. Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of L. pneumophila. *Cellular microbiology*. 9(1):246–264. PMID: [16911566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16911566/)

51. Prados-Rosales R., Baena A., Martinez L. R., Luque-Garcia J., Kalscheuer R., Veeraraghavan U., Camara C., Nosanchuk J. D., Besra G. S., Chen B., Jimenez J., Glatman-Freedman A., Jacobs W. R. Jr., Porcelli S. A. and Casadevall A.. 2011. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *The Journal of clinical investigation*. 121(4):1471–1483. doi: [10.1172/JCI44261](https://doi.org/10.1172/JCI44261) PMID: [21364279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21364279/)
52. Kitchens R. L. and Munford R. S.. 1998. CD14-dependent internalization of bacterial lipopolysaccharide (LPS) is strongly influenced by LPS aggregation but not by cellular responses to LPS. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950). 160(4):1920–1928.
53. Elsbach P. 2000. Mechanisms of disposal of bacterial lipopolysaccharides by animal hosts. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2(10):1171–1180. PMID: [11008107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11008107/)
54. Losick V. P., Haenssler E., Moy M. Y. and Isberg R. R.. 2010. LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB. *Cellular microbiology*. 12(8):1083–1097. doi: [10.1111/j.1462-5822.2010.01452.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01452.x) PMID: [20148897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20148897/)
55. Ge J., Xu H., Li T., Zhou Y., Zhang Z., Li S., Liu L. and Shao F.. 2009. A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the Ikbpa family of inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(33):13725–13730. doi: [10.1073/pnas.0907200106](https://doi.org/10.1073/pnas.0907200106) PMID: [19666608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19666608/)
56. Welsh C. T., Summersgill J. T. and Miller R. D.. 2004. Increases in c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase and p38 activity in monocyte-derived macrophages following the uptake of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*. 72(3):1512–1518. PMID: [14977957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977957/)
57. Orlofsky A., Berger M. S. and Prystowsky M. B.. 1991. Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes. *Cell regulation*. 2(5):403–412. PMID: [1832565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1832565/)
58. Lin E. Y., Orlofsky A., Berger M. S. and Prystowsky M. B.. 1993. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950). 151(4):1979–1988.
59. Karsan A., Yee E., Kaushansky K. and Harlan J. M.. 1996. Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood*. 87(8):3089–3096. PMID: [8605321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8605321/)
60. Zong W. X., Edelstein L. C., Chen C., Bash J. and Gelinas C.. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes & development*. 13(4):382–387.
61. Muller A., Hacker J. and Brand B. C.. 1996. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infection and immunity*. 64(12):4900–4906. PMID: [8945524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8945524/)
62. Ma X., Becker Buscaglia L. E., Barker J. R. and Li Y.. 2011. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *Journal of molecular cell biology*. 3(3):159–166. doi: [10.1093/jmcb/mjr007](https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007) PMID: [21502305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21502305/)
63. Khan A. A., Betel D., Miller M. L., Sander C., Leslie C. S. and Marks D. S.. 2009. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nature biotechnology*. 27(6):549–555. doi: [10.1038/nbt.1543](https://doi.org/10.1038/nbt.1543) PMID: [19465925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465925/)
64. Nahid M. A., Pauley K. M., Satoh M. and Chan E. K.. 2009. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *The Journal of biological chemistry*. 284(50):34590–34599. doi: [10.1074/jbc.M109.056317](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056317) PMID: [19840932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19840932/)
65. Kubori T. and Nagai H.. 2011. Bacterial effector-involved temporal and spatial regulation by hijack of the host ubiquitin pathway. *Frontiers in microbiology*. 2:145. doi: [10.3389/fmicb.2011.00145](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00145) PMID: [21772836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21772836/)
66. Joshi A. D. and Swanson M. S.. 2011. Secrets of a successful pathogen: legionella resistance to progression along the autophagic pathway. *Frontiers in microbiology*. 2:138. doi: [10.3389/fmicb.2011.00138](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00138) PMID: [21743811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21743811/)

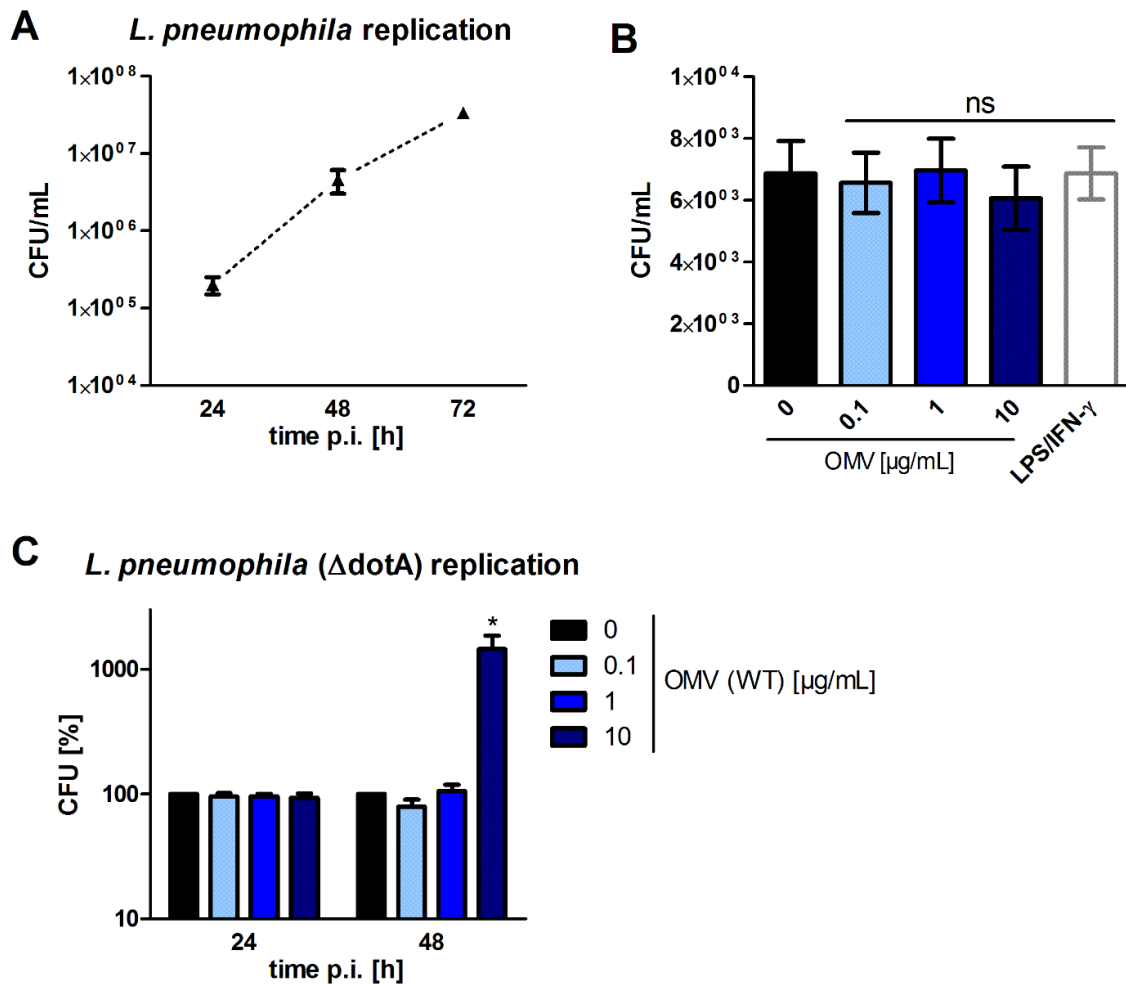
Supporting Information

S1 Fig. Cell viability after OMV treatment.



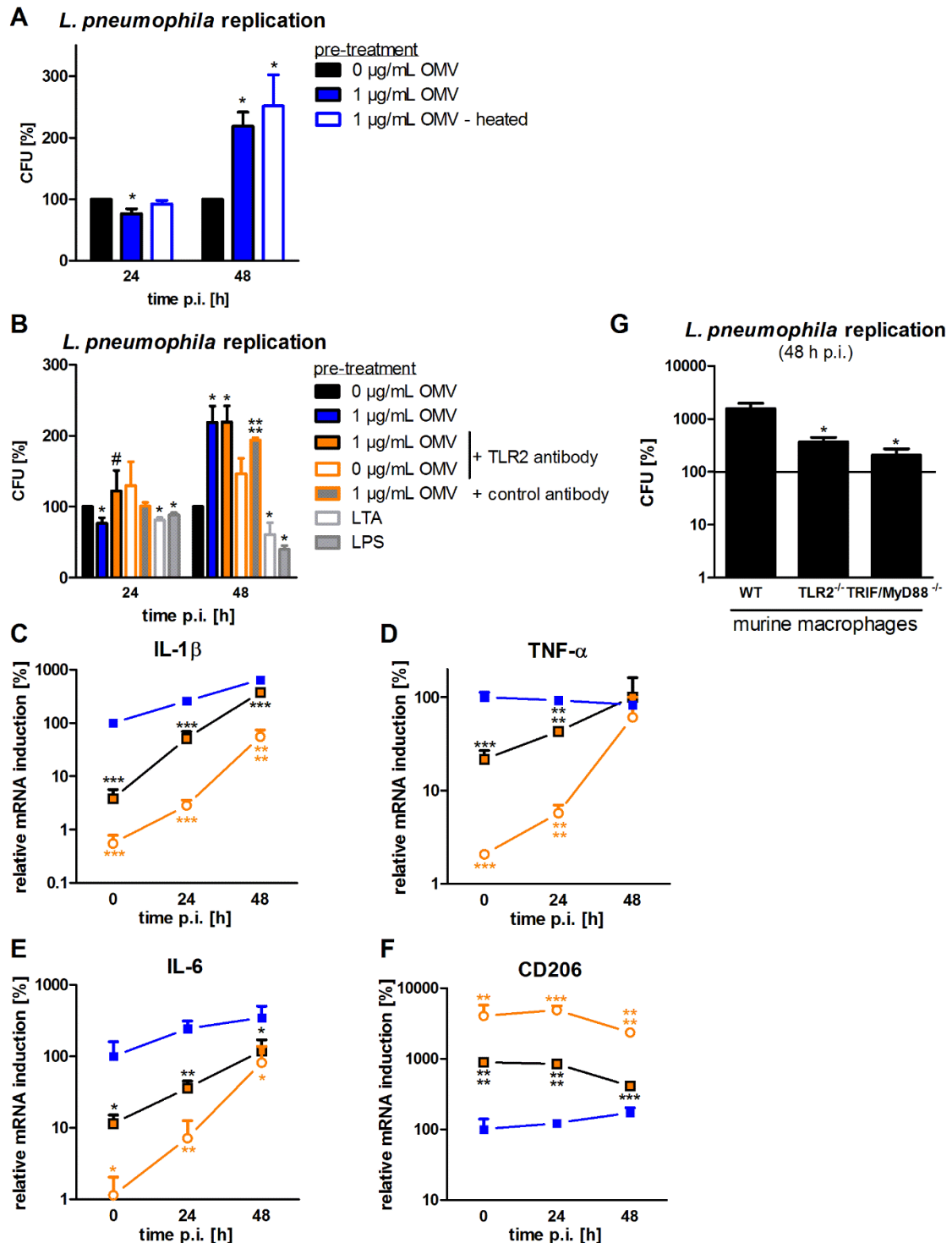
THP-1 cells were treated with different doses of OMVs (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for up to 96 h. Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to untreated control cells at every time point. Results are presented as mean values of four independent experiments, each performed in technical triplicates.

Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs.

S2 Fig. *L. pneumophila* replication in THP-1 cells.

(A) THP-1 cells were infected with *L. pneumophila* at an MOI of 0.5 and bacterial replication was determined by CFU assay. Cells were lysed after the indicated time points. Shown are mean values of three independent experiments each performed in duplicates. (B) *L. pneumophila* uptake in THP-1 cells after pre-treatment with OMVs (0.1, 1 or 10 $\mu\text{g/mL}$) or LPS/IFN- γ is shown by CFU assay; not pre-treated cells served as a control. Shown are mean values of three independent experiments, each performed in duplicates. (C) Bacterial replication of *L. pneumophila* ΔdotA was analyzed in THP-1 cells with OMV pre-treatment (WT *L. pneumophila*) by CFU assay 24 and 48 h p.i.. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Shown are mean values of three independent experiments, each performed in duplicates.

Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ OMVs, ns = not significant.

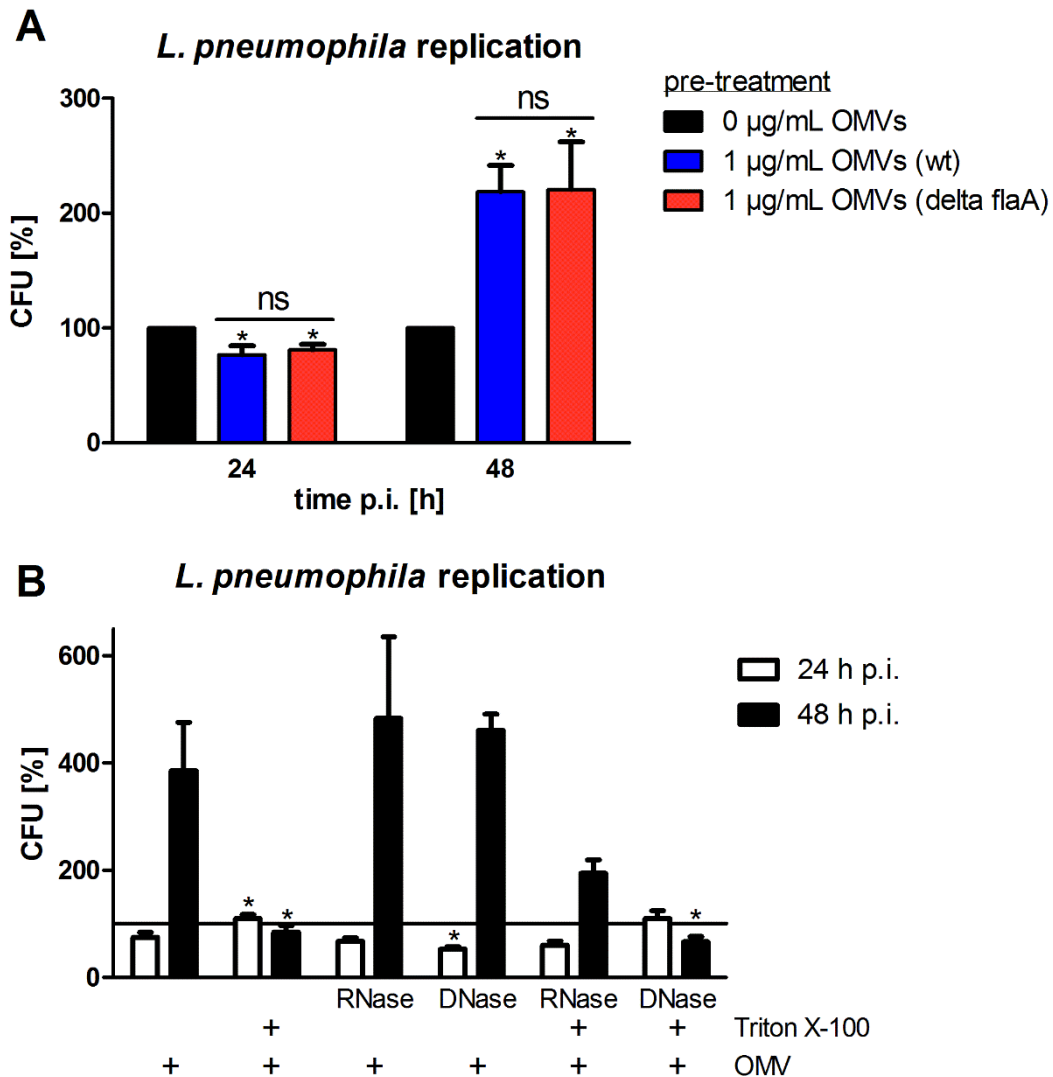
S3 Fig. Influence of OMV proteins and TLR2 activation on *L. pneumophila* replication.

(A) THP-1 cells were pre-incubated with heat inactivated and intact OMVs (1 µg/mL each) 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Bacterial replication was determined by CFU assay. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Mean values of three independent experiments are shown. (B-F) THP-1 cells were pre-incubated with TLR2 blocking antibody or a control (20 µg/mL each) 90 min before OMV stimulation

(1 µg/mL). After 20 h of OMV incubation, cells were infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and lysed for CFU 24 and 48 h p.i. (B). Pre-treatment with LTA (1 µg/mL) or LPS (200 ng/mL) served as a control. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. Mean values of three independent experiments, each performed in duplicates, are shown. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h) or 24 and 48 h p.i.. qPCR was performed for IL-1β (C), TNF-α (D), IL-6 (E), and CD206 (F). Results are calculated relative to the time point of infection (0 h) with 1 µg/mL OMV treatment. Mean values of three independent experiments are shown. Symbol key from S3B Fig is used also in S3C–S3F Fig. (G) *Legionella* replication was determined by CFU assay in mBMDM. Cells from WT, TLR2^{-/-} and TRIF/MyD88^{-/-} mice were pre-treated with 0.1 µg/mL OMV for 20 h and then infected with *L. pneumophila* ΔflaA (MOI 0.5) for 48 h. Bars represent mean values of three biological independent experiments, each performed in duplicates.

Statistics: A: Mann-Whitney test; *p<0.05 compared to corresponding 0 µg/mL OMVs. B: Mann-Whitney test; *p<0.05, ****p<0.0001 compared to corresponding 0 µg/mL OMVs. #p<0.05 compared to 1 µg/mL OMVs. C-F: Mann-Whitney test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared to corresponding 1 µg/mL OMVs. G: Mann-Whitney test; *p<0.05 compared to WT.

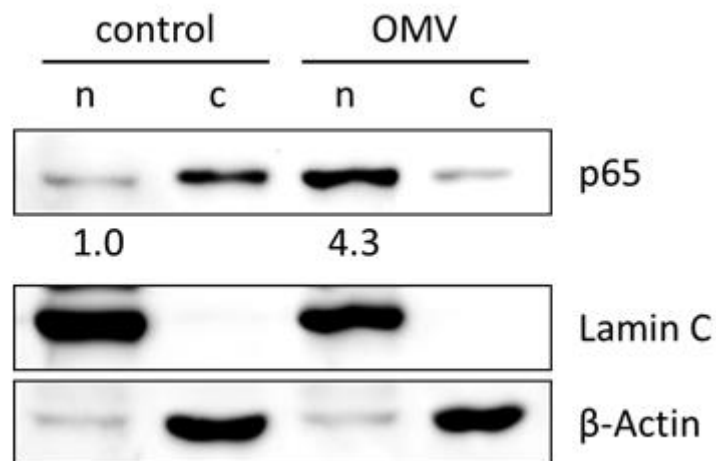
S4 Fig. Increased *L. pneumophila* replication depends on OMV membrane integrity and not on flagellin.



(A) THP-1 cells were pre-incubated for 20 h with OMVs (1 µg/mL) from wildtype *Legionella* or *Legionella* lacking flagellin (Δ flaA) and were then infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Bacterial replication after OMV pre-stimulation was determined by CFU assay 24 and 48 h p.i.. Results are depicted relative to CFU count of not pre-treated (but infected) cells. (B) THP-1 cells were treated with OMVs (1 µg/mL) which were either untreated or treated with RNase (RNase A and RNase III in combination) or DNase alone, respectively, or in combination with Triton X-100 (0.3 %). After 20 h pre-incubation, cells were infected with *L. pneumophila* (MOI 0.5) and bacterial replication was assessed by CFU assay 24 and 48 h p.i.. *L. pneumophila* replication is presented relative to not pre-treated but infected cells. Bars show mean values of three independent experiments, each performed in duplicates.

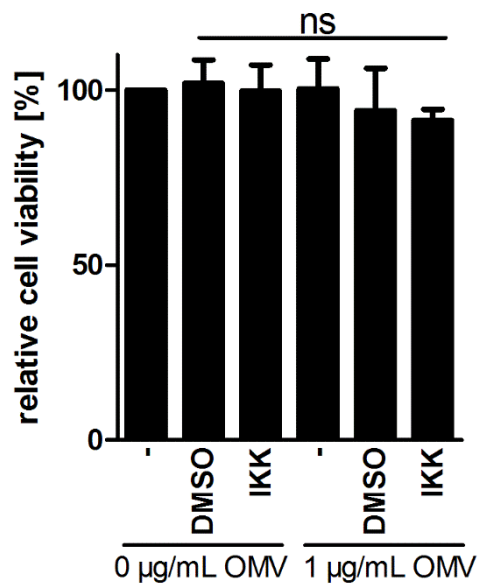
Statistics: A: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to 0 µg/mL OMVs. B: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$ compared to corresponding OMV treated sample.

S5 Fig. Nuclear shuttling of p65 after OMV treatment.



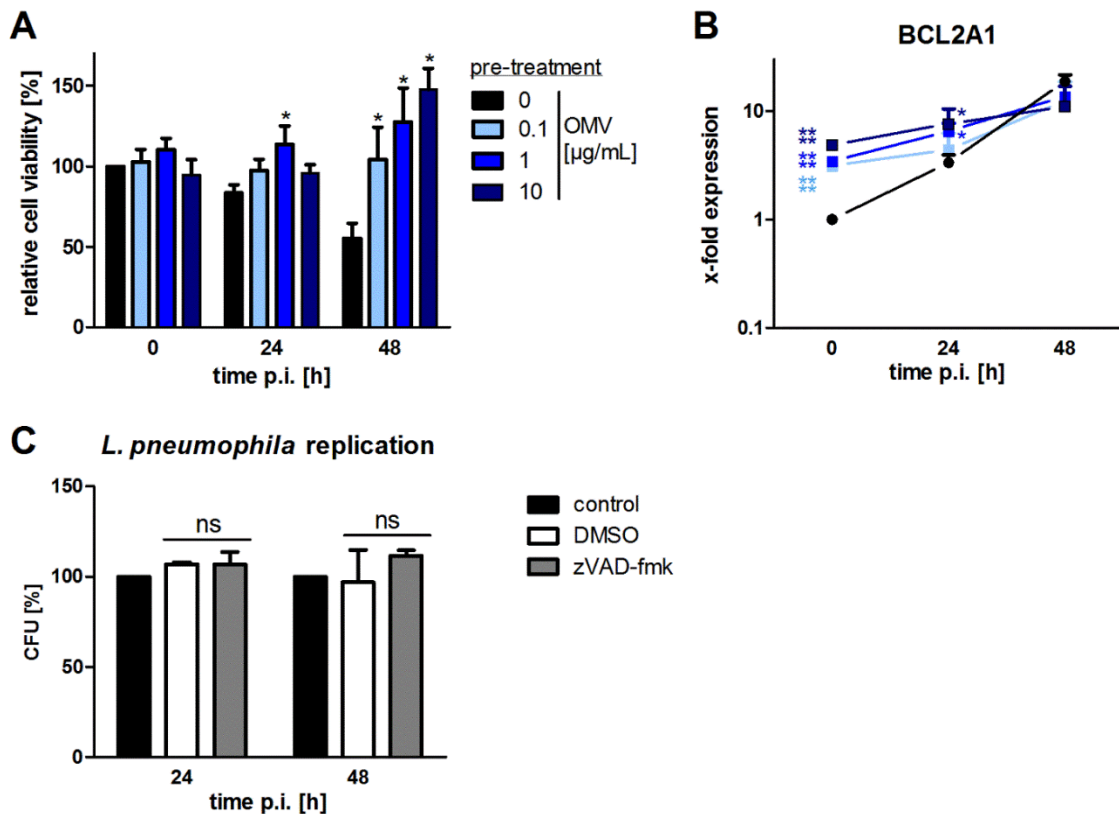
THP-1 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OMVs for 30 min or left untreated as a control. Protein extracts from nucleus and cytosol were generated and the localization of p65 was determined by western blot. Lamin C served as a nuclear loading control and β -actin as a cytosolic loading control. One representative result is shown.

S6 Fig. Cell viability after IKK inhibitor treatment.



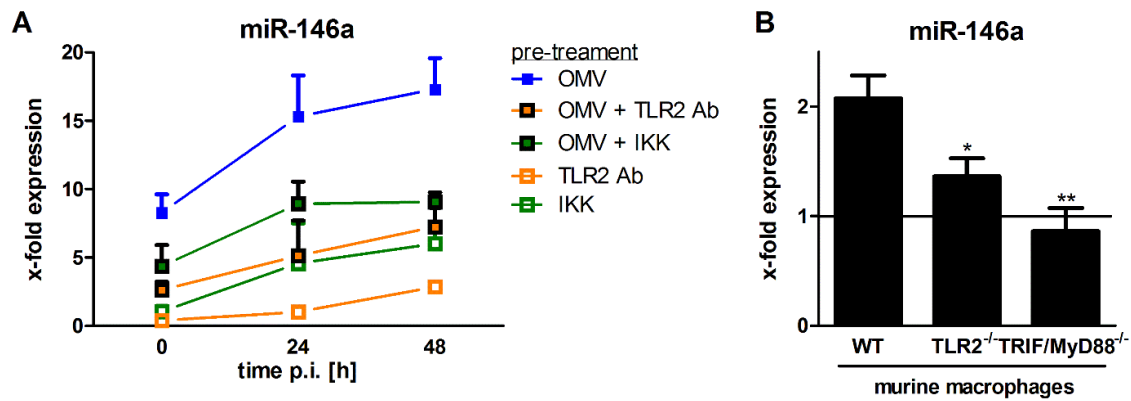
THP-1 cells were treated with IKK inhibitor (1 μ M) or DMSO as a solvent control 90 min before addition of 1 μ g/mL OMVs for 20 h in the indicated samples. Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to 0 μ g/mL OMVs. Bars represent mean values of three independent experiments, each performed in triplicates.

Statistics: Mann-Whitney test; ns = not significant.

S7 Fig. OMV pre-treatment increases cell viability throughout a following infection.

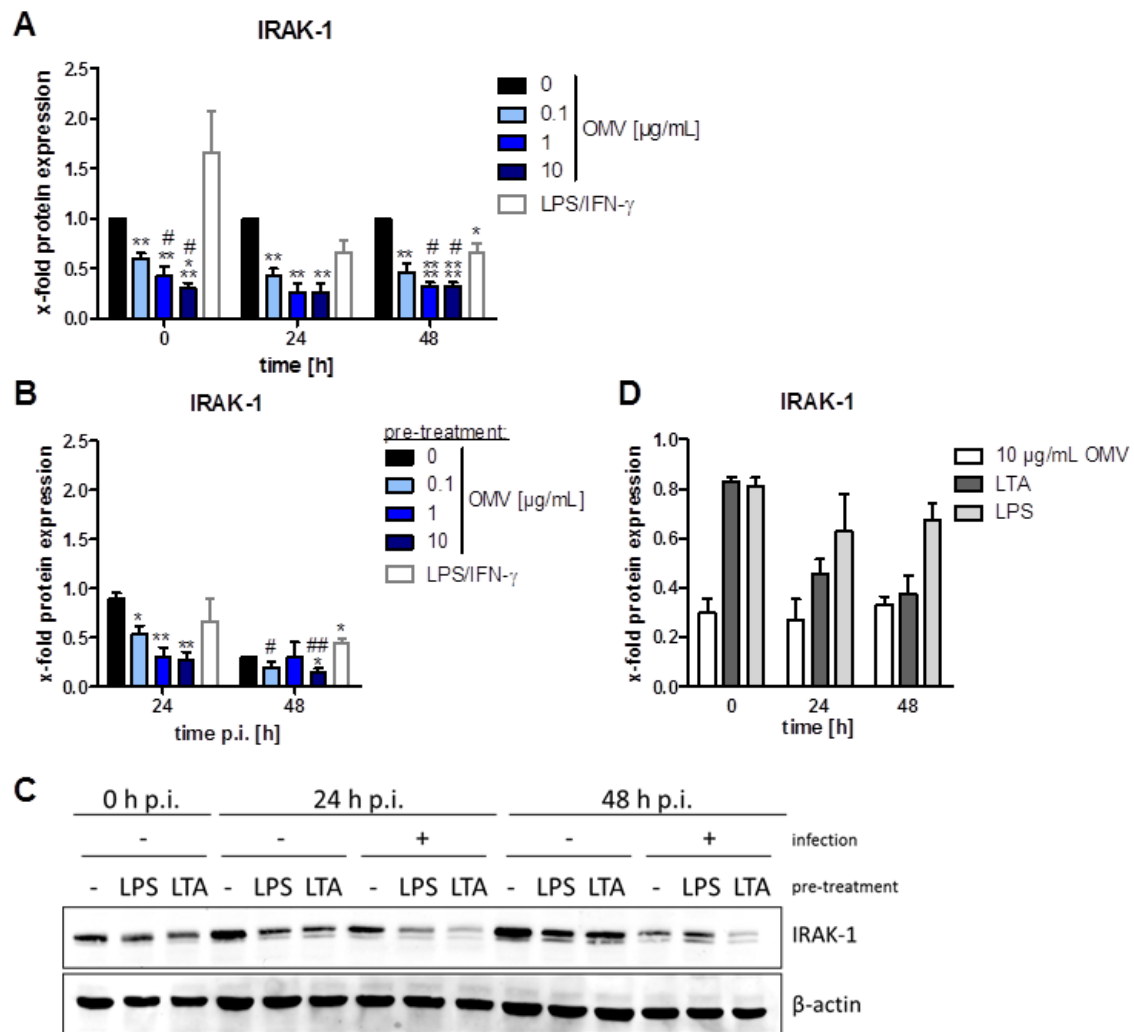
(A) THP-1 cells were pre-treated with OMVs (0.1, 1, 10 µg/mL) for 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5). Cell viability was determined by MTT assay and results are normalized to 0 µg/mL OMVs at every time point. Results are shown as mean values of four independent experiments, each performed in technical triplicates. (B) OMV-treated THP-1 cells (0.1, 1, 10 µg/mL) or control cells were infected with *L. pneumophila* for 24 or 48 h at an MOI of 0.5, respectively. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h) or 24 and 48 h p.i.. qPCR was performed for BCL2A1 and results are normalized to 0 µg/mL OMVs at 0 h p.i.. (C) THP-1 cells were treated with zVAD-fmk (10 µg/mL) or DMSO as a solvent control for 90 min before the infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5) for 24 and 48 h. Bacterial replication was analyzed by CFU assay. Results are present relative to not pre-treated but infected control cells. Bars represent mean values of four biological independent experiments, each performed in duplicates.

Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ compared to 0 µg/mL OMVs or DMSO; ns = not significant.

S8 Fig. miR-146a induction depends on TLR- and NF- κ B signaling.

(A) THP-1 cells were pre-treated with TLR2 blocking antibody (20 μ g/mL) or IKK inhibitor (1 μ M) 90 min before addition of 1 μ g/mL OMVs. Cells were infected after 20 h of OMV stimulation for 24 and 48 h. RNA samples were taken at the time point of infection (0 h), and 24 and 48 h p.i. and the expression of miR-146a was analyzed. Bars represent x-fold expression and are normalized to untreated control cells. Shown are mean values of three biological independent experiments. (B) miR-146a expression was analyzed in mBMDM (WT, TLR2^{-/-}, TRIF/MyD88^{-/-}) after the treatment with 0.1 μ g/mL OMVs for 20 h. Graph represents x-fold expression in comparison to untreated control cells. Bars are mean values of three biological independent experiments.

Statistics: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to WT.

S9 Fig. Varying IRAK-1 degradation after different treatments.

(A-B) Three independent experiments as shown in Fig 6A were quantified and the results normalized to untreated control cells. IRAK-1 degradation after (A) OMV or LPS/IFN-γ stimulation without infection and (B) pre-stimulation plus infection with *L. pneumophila* are shown. (C) IRAK-1 degradation is shown after pre-treatment of THP-1 cells with LPS (200 ng/mL) or LTA (1 µg/mL) 20 h before infection with *L. pneumophila* (MOI 0.5) at the time point of infection (0 h) and 24 and 48 h p.i. One representative experiment out of three biological independent experiments is shown. (D) Comparison of remaining IRAK-1 protein levels after the different treatments (OMV, LTA, LPS) from S9A and S9C Fig. Mean values of three independent experiments are shown.

Statistics: A-B: Mann-Whitney test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to 0 µg/mL OMVs. # $p < 0.05$ compared to LPS/IFN-γ treated cells.

5.2 Angabe der eigenen Anteile an der für die Dissertation berücksichtigten Publikation

Jung AL, Stoiber C, Herkt CE, Schulz C, Bertrams W, Schmeck B. *Legionella pneumophila*-derived outer membrane vesicles promote bacterial replication in macrophages. PLoS Pathog. 2016 Apr 22; 12(4):e1005592

Der Eigenanteil zur Erstellung dieser Publikation umfasst den Versuchsaufbau, die Versuchsdurchführung, die Datenanalyse und Statistik zu Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung S1, S2, S3A-F, S4, S6, S7, S8 und S9. Im Rahmen eines von mir betreuten Praktikums wurden die in Abbildung 1 gezeigten Experimente durchgeführt. Die in Abbildung S3G und S5 gezeigten Versuche wurden durch mich entworfen und ausgewertet. Des Weiteren habe ich das Manuskript geschrieben und die präsentierten Abbildungen erstellt.

5.3 Tabellarischer Lebenslauf

Für den finalen Druck entfernt.

5.4 Tagungsbeiträge

Merkel AL, Heinrich EM, Bolte K, Herkt C, Sittka A, Scheller N and Schmeck B. *Legionella pneumophila* infection of THP-1 cells alters the amount and miRNA content of released exosomes (poster presentation) – 11th Annual Retreat of the International Graduate Programme Molecular Biology and Medicine of the Lung, 2013, Rauschholzhausen, Germany.

Merkel AL, Heinrich EM, Bolte K, Herkt C, Sittka A, Scheller N and Schmeck B. *Legionella pneumophila* infection of macrophages alters the amount and miRNA content of released exosomes (oral presentation) – Herbsttagung der Sektionen Infektiologie & Tuberkulose und Zellbiologie der DGP, 2013, Marburg, Germany.

Merkel AL, Heinrich EM, Bolte K, Herkt C, Sittka A, Scheller N and Schmeck B. Die Infektion von Makrophagen mit *Legionella pneumophila* beeinflusst die Anzahl und den miRNA-Gehalt freigesetzter Exosomen (oral presentation) – 55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. und 36. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., 2014, Bremen, Germany.

Merkel AL, Heinrich EM, Bolte K, Herkt C, Sittka A, Scheller N and Schmeck B. *Legionella pneumophila* infection of macrophages alters the amount and miRNA content of released exosomes (oral presentation) – International Society for Extracellular Vesicles, 2014, Rotterdam, Netherlands.

Merkel AL, Heinrich EM, Bolte K, Herkt C, Sittka A, Scheller N and Schmeck B. Exosomes in response to *Legionella pneumophila* infection of human macrophages – 12th Annual Retreat of the International Graduate Programme Molecular Biology and Medicine of the Lung, 2014, Rauschholzhausen, Germany.

Merkel AL, Stoiber C, Herkt C, Schulz C, Bertrams W and Schmeck B. *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles are potent pro-inflammatory stimulators (oral presentation) – Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, 2015, Marburg, Germany.

Jung AL, Stoiber C, Herkt C, Schulz C, Bertrams W and Schmeck B. *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles are potent pro-inflammatory stimulators (poster presentation) – TOLL 2015 – Targeting Innate Immunity, 2015, Marbella, Spain.

Jung AL, Stoiber C, Herkt C, Schulz C, Bertrams W and Schmeck B. *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles are potent pro-inflammatory stimulators (oral presentation) – Herbsttagung der Sektionen Infektiologie & Tuberkulose und Zellbiologie der DGP, 2015, München, Germany.

Jung AL, Stoiber C, Herkt C, Schulz C, Bertrams W and Schmeck B. *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles are potent pro-inflammatory stimulators for macrophages (oral presentation) – International Society for Extracellular Vesicles, 2016, Rotterdam, Netherlands.

5.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Aigner, Bauer S, Bauer U-M, Brehm, Bremmer, Buchholz, Cherkasov, Czubayko, Daut, Dehnen, Elsässer, Fritz, Garten, Greiner, Grzeschik, Jacob, Käuser, Koolman, Lill, Lohöfer, Lohoff, Maisner, Müller, Müller-Brüsselbach, Öffner, Ocker, Parak, Plant, Preisig-Müller, Röhm, Schäfer, Suske, Vollmer, Westermann, Wrocklage

5.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Schmeck für die Vergabe des interessanten und vielschichtigen Themas bedanken und die Möglichkeit der praktischen Durchführung dieser Dissertation. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die Betreuung und ihren wissenschaftlichen Rat.

Dank gilt Herrn Dr. Wilhelm Bertrams für seine Betreuung. Unsere zahlreichen fachlichen Diskussionen waren mir immer eine große Hilfe für das Voranschreiten meiner Arbeit. Seine Hilfe war stets spontan und ich konnte von seinen Erfahrungen in der Welt der Makrophagen lernen.

Frau Dipl. Biol. Christine Schulz danke ich für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und ihre guten Ratschläge. Für alle kleineren und größeren Probleme des Laboralltags hatte sie immer ein offenes Ohr und die passenden Lösungen parat.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Kerstin Hoffmann, die mich immer tatkräftig im Labor unterstützte.

Allen Gruppenmitgliedern des Instituts für Lungenforschung danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Markus Schnare danke ich für die zur Verfügung gestellten TLR2^{-/-} und TLR2/4^{-/-} Mäuse und Herrn Prof. Dr. Carsten Kirschning für die Knochen von TRIF/MyD88^{-/-}-Mäusen.

Benni und meiner Familie danke ich für die nicht-wissenschaftlichen Gespräche und die moralische Unterstützung, die sie mir während der Zeit meiner Doktorarbeit zukommen ließen. Ohne euren Glauben an mich, wäre das nur schwer möglich gewesen!

5.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles auf die bakterielle Replikation in Makrophagen“ im Institut für Lungenforschung unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Schmeck ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Jung AL, Stoiber C, Herkt CE, Schulz C, Bertrams W, Schmeck B. *Legionella pneumophila*-derived outer membrane vesicles promote bacterial replication in macrophages. PLoS Pathog. 2016 Apr 22; 12(4):e1005592

Ort, Datum

Unterschrift (Anna Lena Jung)